

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program:

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Jan Válka

ROLE DNA REPARAČNÍCH MECHANISMŮ V PATOGENEZI MYELOYDYSPLASTICKÉHO SYNDROMU

THE ROLE OF DNA REPAIR MECHANISMS IN THE PATHOGENESIS OF
MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME

Disertační práce

Školitel a vedoucí závěrečné práce:

doc. MUDr. Jaroslav Čermák, CSc.

Konzultant:

RNDr. Monika Belíčková, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 11. 09. 2018

Jméno – Příjmení

Podpis

Identifikační záznam:

VÁLKA, Jan. *Role DNA reparačních mechanismů v patogenezi myelodysplastického syndromu (The role of DNA repair mechanisms in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome)*. Praha, 2018. Počet stran 84, počet příloh 7. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav hematologie a krevní transfuze. Školitel doc. MUDr. Jaroslav Čermák CSc.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat zejména svému školiteli doc. MUDr. Jaroslavu Čermákovi, CSc. za uvedení do oboru hematologie, cenné rady a podporu po dobu postgraduálního studia.

Stejně tak bych rád poděkoval konzultantce mého studia Mgr. Monice Belíčkové za její nepostradatelné rady, nápady a připomínky, konzultace výsledků a korekturu prací a zejména za trpělivost, se kterou mne učila základům vědecké práce a orientace ve světě vědy.

Mé poděkování patří také všem zaměstnancům Oddělení genomiky Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT), jmenovitě pak Mgr. Jitce Veselé, RNDr. Haně Votavové, Ph.D. a Ing. Michaele Dostálové Merkerové, Ph.D., za jejich rady, náměty a praktickou výuku laboratorních metod.

Taktéž musím poděkovat všem lékařům Klinického úseku ÚHKT za poskytnutí klinických údajů o vyšetřovaných pacientech, a laboratorním pracovníkům Morfologicko-cytochemické laboratoře ÚHKT a Oddělení cytogenetiky ÚHKT za možnost použít výsledky jimi provedených vyšetření. Jmenovitě musím poděkovat zejména MUDr. Daně Mikulenkové, RNDr. Janě Březinové, Ph.D. a MUDr. Jacqueline Soukupové Maaloufové.

Dále děkuji MUDr. Anně Jonášové, Ph.D. z I. Interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice, jejíž pacienti byli do provedených studií taktéž zařazeni.

Děkuji také prof. MUDr. Petru Cetkovskému, Ph.D., MBA za poskytnutou příležitost pracovat, provádět vědecký výzkum a dále se vzdělávat v hematologii jako zaměstnanec ÚHKT a MUDr. Petru Soukupovi za skvělé vedení v roli začínajícího klinického hematologa.

Velké poděkování patří všem pacientům, jejichž vzorky byly v průběhu práce analyzovány, za souhlas se zpracováním biologického materiálu pro výzkumné účely.

Nakonec bych moc rád poděkoval své rodině a své přítelkyni Mgr. Zuzaně Janušové za podporu a trpělivost.

Obsah

Prohlášení	2
Identifikační záznam	3
Poděkování	4
Obsah	5
Seznam použitých zkratk	7
Souhrn	8
Summary (souhrn v anglickém jazyce)	10
1. Teoretický úvod	11
1.1. Myelodysplastický syndrom.	11
1.1.1. Definice a epidemiologie	11
1.1.2. Patogeneze	11
1.1.3. Klasifikace a prognóza	15
1.1.4. Klinické projevy	20
1.1.5. Diagnostika	21
1.1.6. Přehled terapie	21
1.2. Buněčné dráhy DNA reparačních mechanismů	24
1.2.1. Úvod	24
1.2.2. Zdroje poškození DNA a rozdělení DNA reparačních mechanismů	24
1.2.3. Base excision repair	25
1.2.4. Nucleotide excision repair	26
1.2.5. Mismatch repair	27
1.2.6. Dvouřetězcové zlomy DNA	29
1.2.7. Oprava homologní rekombinací	30
1.2.8. Nehomologní spojování konců	30
2. Cíle práce a výchozí hypotézy	32
3. Studovaný materiál a použité metody	33
3.1. Soubor vyšetřovaných pacientů	33
3.2. Separace buněk a extrakce RNA	36
3.3. PCR v reálném čase (Real-Time PCR)	36
3.4. Imunohistochemický průkaz proteinu RAD51	37
3.5. Cílené sekvenování vybraných DNA reparačních genů	38
3.6. Validace vybraných jednonukleotidových polymorfismů	38
3.7. Statistická analýza dat genové exprese	38
3.8. Bioinformatická a statistická analýza sekvenačních dat	39
4. Výsledky	40
4.1. Hodnocení exprese DNA reparačních genů u pacientů s MDS	40
4.1.1. Některé DNA reparačních geny mají u pacientů s MDS deregulovanou genovou expresi	40
4.1.2. Hladina genové exprese genů <i>RAD51</i> , <i>XRCC2</i> a <i>RPA3</i> vykazuje klesající tendenci od časných k pozdním formám MDS	44
4.1.3. Na podkladě rozdílných hladin exprese genů <i>RAD51</i> , <i>XRCC2</i> a <i>RPA3</i> lze nemocné rozdělit do skupin s odlišným celkovým přežitím	51
4.1.4. Abnormality 7. chromozomu jsou spojeny s nejnižší hladinou exprese genů <i>XRCC2</i> a <i>RAD51</i>	53

4.1.5. Při progresi MDS dochází u konkrétního pacienta k postupnému snížení exprese genů <i>RAD51</i> a <i>XRCC2</i>	56
4.1.6. Hladina exprese genu <i>RAD51</i> v čase diagnózy je významným nezávislým prognostickým faktorem pro celkové přežití pacientů s MDS	57
4.1.7. Imunohistochemická aktivita proteinu RAD51 je odlišná u pacientů s MDS nízkého a vysokého rizika	58
4.2. Sekvenační analýza genů DNA reparace u pacientů s MDS	59
4.2.1. Detekce genetických variant cíleným sekvenováním a výběr variant potenciálně asociovaných se vznikem MDS	59
4.2.2. Validací studie asociací mezi MDS a vybranými genetickými polymorfismy	60
4.2.3. Identifikace nových mutací v DNA reparačních genech u pacientů s MDS	62
4.2.4. Funkční důsledky nově popsané posunové mutace c.789_790delCA v genu <i>XRCC2</i>	63
5. Diskuze	66
5.1. Hodnocení exprese DNA reparačních genů u pacientů s MDS	66
5.2. Sekvenační analýza genů DNA reparace u pacientů s MDS	70
6. Závěry	73
Seznam použité literatury	75
Internetové zdroje	81
Zdroje obrázků	82
Seznam publikací autora	83
Přílohy	84

Seznam použitých zkratek

AML	Akutní myeloidní leukemie
AML s MLD (sAML)	AML s myelodysplastickými změnami (sekundární AML)
AP místo	Apurinové/apyrimidinové místo
BER	Oprava vyštěpením báze
CI	Interval spolehlivosti
CMML	Chronická myelomonocytární leukemie
DDR	Odpověď na poškození DNA
DSB	Dvouřetězcový zlom (DNA)
FAB	Francouzsko-americko-britská (klasifikace)
FC	Násobek změny (fold change)
FISH	Fluorescenční in-situ hybridizace
HR	Hazard ratio
HR	Homologní rekombinace
IL-1	Interleukin-1
IPSS	Mezinárodní prognostický skórovací systém
IPSS-R	Revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém
KD	Kostní dřev
MAF	Frekvence minoritní alely
MDS	Myelodysplastický syndrom
MDS-U	Myelodysplastický syndrom neklasifikovaný
MDS/MPN	Myelodysplastický syndrom/Myeloproliferativní neoplazie
MMR	Oprava chybného párování bází
NER	Oprava vyštěpením nukleotidu
NGS	Sekvenování nové generace
NHEJ	Nehomologní spojování konců
OR	Odds ratio
OS	Celkové přežití
PK	Periferní krev
PNH	Paroxysmální noční hemoglobinurie
RA	Refrakterní anémie
RAEB-1	Refrakterní anémie s přebytkem blastů 1
RAEB-2	Refrakterní anémie s přebytkem blastů 2
RAEB-T	Refrakterní anémie s přebytkem blastů v transformaci
RARS	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RCMD	Refrakterní cytopenie s dysplazií ve více řadách
RN	Refrakterní neutropenie
RNS	Reaktivní dusíkaté entity
ROS	Reaktivní kyslíkové entity
RT-PCR	Polymerátová řetězová reakce v reálném čase
SNP	Jednonukleotidové polymorfismy
TGF- β	Transformující růstový faktor beta
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa
WHO	Světová zdravotnická organizace

Souhrn

Předpoklady a cíle:

Vysoký výskyt mutací a cytogenetických abnormalit u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) naznačuje přítomnost defektů v mechanismech DNA reparace. První část práce se zaměřuje na monitoraci genové exprese DNA reparačních genů a její změny v průběhu progresu onemocnění. Ve druhé části studie bylo použito sekvenování nové generace k detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNP) a mutací v DNA reparačních genech a byla hodnocena možná asociace těchto genetických abnormalit s rizikem rozvoje MDS.

Metody:

Expresní profilování 84 DNA reparačních genů bylo provedeno na CD34 pozitivních buňkách kostní dřeně pacientů s MDS. Skrínigová kohorta sestávala z 28 pacientů a exprese vybraných genů byla dále hodnocena v rozšířené kohortě 122 pacientů se všemi podtypy MDS. Sériové vzorky byly použity k monitoraci exprese genů *RAD51* a *XRCC2* v průběhu progresu onemocnění. Imunohistochemický průkaz RAD51 rekombinázy byl proveden u trepanobiopsických vzorků. Cílené sekvenování exonových oblastí 84 DNA reparačních genů bylo provedeno ve skrínigové kohortě MDS pacientů. Real-Time PCR byla použita ke zhodnocení genotypu vybraných SNP v populační studii.

Výsledky:

Geny *RAD51* a *XRCC2* vykazovaly odlišnou expresi mezi MDS nízkého a vysokého rizika ($p < 0,0001$), zatímco exprese genu *RPA3* byla celkově snížena v celé kohortě zkoumaných pacientů ($FC = -2,65$, $p < 0,0001$). Prokázali jsme, že exprese genů *RAD51* a *XRCC2* v průběhu progresu MDS u konkrétních pacientů postupně klesá. Snížení exprese genů *XRCC2* a *RAD51* bylo spojeno s abnormalitami chromozomu 7 ($p = 0,0001$; $p = 0,0457$). Imunohistochemické barvení odhalilo přítomnost proteinu RAD51 u MDS nízkého rizika pouze v cytoplazmě, zatímco u MDS vysokého rizika byl protein přítomen jak v cytoplazmě, tak v buněčném jádru. Multivariantní analýza identifikovala hladinu exprese genu *RAD51* jako signifikantní nezávislý prognostický faktor pro celkové přežití pacientů s MDS ($HR = 0,43$; $p = 0,0022$). Ve skrínigové kohortě byla prokázána asociace šesti SNP s tendencí ke vzniku MDS: rs4135113 (*TDG*, $p = 0,0287$), rs12917 (*MGMT*, $p = 0,0032$), rs2230641 (*CCNH*, $p = 0,0118$), rs2228529 a rs2228526 (*ERCC6*, $p = 0,0378$ a $p = 0,0261$) a rs1799977

(*MLH1*, $p = 0,0449$). V populační studii byl spojen se vznikem MDS pouze polymorfismus v genu *MLH1* a to ve skupině pacientů s nepříznivou cytogenetikou ($p = 0,0004$). U pacientky s MDS RAEB-2 byla popsána nová mutace s posunem čtecího rámce v genu *XRCC2*. Tato mutace vede ke vzniku zkráceného nefunkčního proteinu a snížení hladiny exprese genu *XRCC2*. U pacientky byly také přítomny snížené hladiny exprese DNA reparačních genů funkčně spojených s mutovaným *XRCC2*. Mimo tuto mutaci byly také nově popsány synonymní substituční mutace v genu *PRKDC* a missense mutace v genech *SMUG1* a *XRCC1*.

Závěry:

Předkládaná práce prokazuje, že exprese DNA reparačních faktorů, zejména *RAD51* a *XRCC2*, je u MDS deregulována a vykazuje specifické změny ve vztahu k prognostickým kategoriím onemocnění. Dále tato práce popisuje přítomnost genetických variant v genech DNA reparace u pacientů s MDS, a možné asociace těchto variant s rizikem vzniku MDS.

Klíčová slova:

myelodysplastický syndrom, DNA reparace, homologní rekombinace, *RAD51*, *XRCC2*, jednonukleotidové polymorfismy

Summary

Background:

The high incidence of mutations and cytogenetic abnormalities in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) suggests the involvement of DNA repair mechanism defects in the pathogenesis of this disorder. The first part of this work was focused on monitoring of gene expression of DNA repair genes in MDS patients and on their alterations during disease progression. In the second part, next generation sequencing was used to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) and mutations in DNA repair genes and their possible association with MDS development was evaluated.

Methods:

Expression profiling of 84 DNA repair genes was performed on bone marrow CD34+ cells of patients with MDS. Screening cohort consisted of 28 patients and expression of selected genes was further validated on larger cohort of 122 patients with all subtypes of MDS. Paired samples were used for monitoring of *RAD51* and *XRCC2* gene expression during disease progression. Immunohistochemical staining for RAD51 recombinase protein was done on samples acquired by trephine-biopsy. Targeted enrichment resequencing of exonic parts of 84 DNA repair genes was performed on the screening cohort of MDS patients. Real-time PCR was used for genotyping of selected SNPs in the population study.

Results:

RAD51 and *XRCC2* genes showed differential expression between low-risk and high-risk MDS ($p < 0.0001$), whereas *RPA3* gene expression was generally decreased among the entire cohort ($FC = -2.65$, $p < 0.0001$). We demonstrated that *RAD51* and *XRCC2* expressions gradually decreased during progression of MDS. Down-regulation of *XRCC2* and *RAD51* expression was associated with abnormalities on chromosome 7 ($p = 0.0858$, $p = 0.0457$). Immunohistochemical staining revealed the presence of RAD51 protein only in the cytoplasm of low-risk MDS, while in both the cytoplasm and nucleus in high-risk MDS. The multivariate analysis identified *RAD51* expression level as a significant independent prognostic factor for overall survival of MDS patients ($HR = 0.49$; $p = 0.0001$). In the screening cohort, six candidate SNPs were associated with the tendency to develop MDS: rs4135113 (*TDG*, $p = 0.0287$), rs12917 (*MGMT*, $p = 0.0032$), rs2230641 (*CCNH*, $p = 0.0118$),

rs2228529 and rs2228526 (*ERCC6*, $p = 0.0378$ and $p = 0.0261$) and rs1799977 (*MLH1*, $p = 0.0449$). In the population study, only the polymorphism in *MLH1* showed significant association with MDS development in patients with poor cytogenetics ($p = 0.0004$). A new frameshift mutation in *XRCC2* gene was identified in MDS RAEB-2 patient. It leads to the formation of a truncated non-functional protein and decreases *XRCC2* gene expression level. Decreased expression levels of all DNA repair genes functionally connected with mutated *XRCC2* were also present. Moreover, a synonymous substitution in *PRKDC* gene and two missense mutations in *SMUG1* and *XRCC1* genes were newly described.

Conclusions:

The presented work demonstrates that the gene expression of DNA repair factors, primarily *RAD51* and *XRCC2*, is deregulated in MDS patients with specific pattern according to prognostic categories. Moreover, the study describes that genetic variants are present in DNA repair genes of MDS patients and may be associated with susceptibility to MDS.

Keywords:

myelodysplastic syndrome, DNA repair, homologous recombination, *RAD51*, *XRCC2*, single nucleotide polymorphisms

1. Teoretický úvod

1.1. Myelodysplastický syndrom

1.1.1 Definice a epidemiologie

Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje skupinu maligních onemocnění vycházejících z hematopoetické kmenové buňky, která jsou charakterizována dysplazií kostní dřeně (KD), jednou nebo vícero cytopeniemi v periferní krvi a zvýšeným sklonem k rozvoji akutní myeloidní leukemie (AML) (Swerdlow S.H. et al., 2008; Garcia-Manero G., 2012).

Incidence MDS činí v populaci přibližně 5 případů na 100 000 obyvatel, výrazně však stoupá s věkem a dosahuje 20 až 50 případů na 100 000 obyvatel v 60 letech věku (Malcovati L. et al., 2013). Medián věku při diagnóze se pohybuje mezi 65 až 70 lety (Ma X., 2012).

Etiologie MDS je komplexní a u většiny případů nejsou známy jasné faktory vyvolávající toto onemocnění. Vyšší riziko vzniku MDS mají osoby s anamnézou chemoterapie obsahující látky poškozující DNA, jako jsou inhibitory topoizomerázy II (Heisig P., 2009; Leone G. et al., 2010) a také osoby, které byly v dlouhodobém kontaktu s některými chemickými látkami, například benzenem (Aul C. et al., 1998), nebo byly vystaveny gama záření (Iwanaga M. et al., 2011). Malou, ale patofyziologicky významnou skupinu pacientů s vysokou incidencí vzniku MDS tvoří nemocní s vrozenými syndromy selhání kostní dřeně a zejména nemocní s vrozenými onemocněními s poruchou DNA reparace, jako například Fanconiho anemie (Cioc A.M. et al., 2010).

1.1.2 Patogeneze

Kompletní patogenetický mechanismus vzniku MDS zůstává nejasný. Současný model patogeneze MDS je založen na teorii klonální hematopoézy (Steensma D.P. et al., 2015). V časně fázi onemocnění dochází vlivem mutace v některém z genů klíčových pro diferenciaci hematopoetické buňky ke vzniku patologického buněčného klonu. Přítomnost tohoto patologického klonu vyvolá v organismu abnormální imunitní odpověď s aktivací cytotoxických T-lymfocytů a makrofágů produkujících řadu prozánětlivých cytokinů (například TNF- α , TGF- β , IL-1 a další), jejímž důsledkem je zvýšení proliferace nezralých hematopoetických prekurzorů a naopak zvýšená apoptóza diferencovanějších buněk. Progrese choroby do další, pozdní, fáze je poté spojena s nestabilitou genomu patologického klonu a vznikem nových somatických mutací a chromozomálních přestaveb, které tomuto klonu poskytují proliferační výhodu, interferují s procesem apoptózy a brání fyziologické

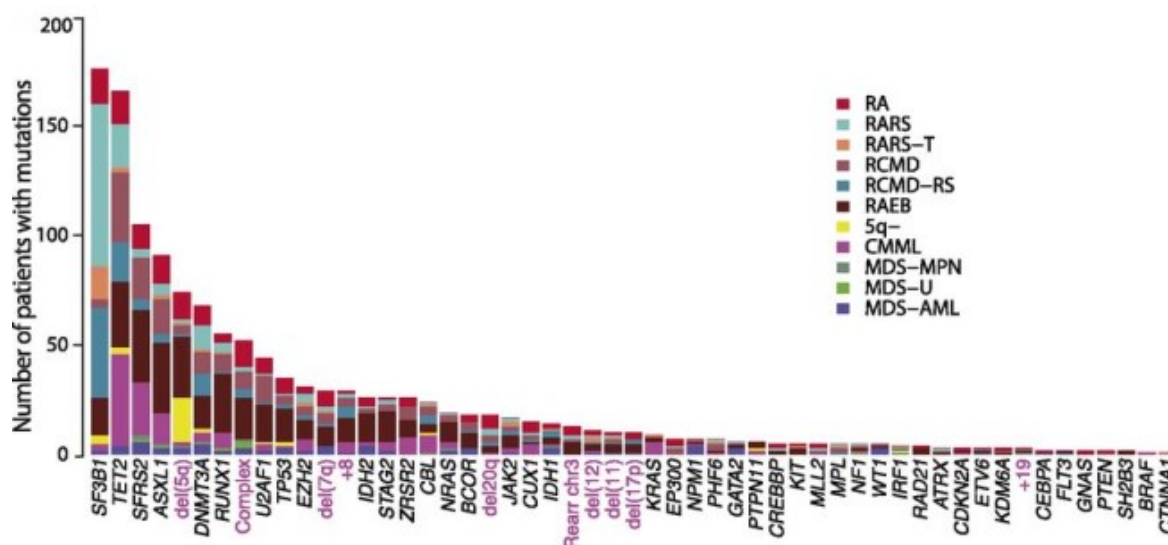
diferenciaci prekurzorových buněk ve zralé krevní elementy. Konečným důsledkem tohoto procesu je postupná akumulace nízké diferencovaných CD34 pozitivních (CD34+) buněk s narušenou apoptózou a vývoj do akutní myeloidní leukemie (Čermák J. et al., 2013).

Pozornost výzkumníků, zabývajících se patogenezi MDS, je v poslední době upřena na detekci somatických mutací hematopoetických buněk dávajících vznik klonální krvevorbě a umožňujících progresi patologického klonu myeloidních buněk. Nedávné studie, využívající metod sekvenování nové generace a provedené na velkých kohortách pacientů s MDS, odhalily přítomnost alespoň jedné somatické mutace v 74–90 % případů MDS (Bejar R. et al., 2011; Papaemmanuil E. et al., 2013; Haferlach T. et al., 2014). Tyto takzvané myeloidní mutace se vyskytují ve skupině asi 60 genů, které lze z funkčního hlediska rozdělit do několika kategorií: transkripční faktory (*RUNX1*, *TP53*), DNA metylace (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/IDH2*), modifikace histonů (*ASXL1*), geny RAS dráhy (*NRAS*, *KRAS*) a sestřihové faktory (*SF3B1*, *SRSF2*) (Raza A., Galili N., 2011). Uvedené geny představují pouze příklady nejčastěji mutovaných genů z každé skupiny, bližší představu o frekvenci mutací a přehled nejčastěji mutovaných genů přináší tabulka 1.1 a obrázek 1.1.

Tabulka 1.1 Frekvence nejčastějších mutací a jejich asociace s mediánem přežití pacientů (upraveno podle Bejar R. et al., 2011).

Mutovaný gen	Počet případů (%)	Medián přežití v letech (95% CI)	p-hodnota
Všechny vzorky	439 (100)	1,86 (1,60–2,14)	
<i>TET2</i>	90 (20,5)	1,88 (1,26–2,55)	0,480
<i>ASXL1</i>	63 (14,4)	1,33 (0,96–1,88)	0,003
<i>RUNX1</i>	38 (8,7)	1,16 (0,77–1,53)	< 0,001
<i>TP53</i>	33 (7,5)	0,65 (0,44–1,10)	< 0,001
<i>EZH2</i>	28 (6,4)	0,79 (0,67–1,40)	< 0,001
<i>NRAS</i>	16 (3,6)	1,03 (0,44–1,98)	0,006
<i>JAK2</i>	13 (3,0)	2,14 (1,02–3,12)	0,960
<i>ETV6</i>	12 (2,7)	0,83 (0,62–2,29)	0,040
<i>CBL</i>	10 (2,3)	1,52 (0,14–1,71)	0,020
<i>IDH2</i>	9 (2,1)	1,58 (0,50–2,14)	0,030
<i>NPM1</i>	8 (1,8)	2,18 (0,59–2,74)	0,430
<i>IDH1</i>	6 (1,4)	3,30 (0,35–9,52)	0,520
<i>KRAS</i>	4 (0,9)	0,89 (0,36–7,44)	0,540

Obrázek 1.1 Frekvence mutací a cytogenetických změn identifikovaných u 738 pacientů rozdělených do jednotlivých podtypů MDS (Papaemmanuil E. et al., 2013).



Mimo somatické mutace nacházíme u pacientů s MDS velmi často také chromozomální aberace; cytogenetické abnormality v karyotypu jsou v čase diagnózy přítomny asi u 50 % pacientů s MDS a jejich četnost stoupá s progresí onemocnění. Nejčastějšími chromozomálními aberacemi, přítomnými u 5–10 % případů MDS, jsou delece dlouhého ramene chromozomu 5 (5q-), monosomie nebo delece dlouhého ramene chromozomu 7 (7/7q-) a trisomie chromozomu 8 (+8) (Haase D. et al., 2007). Izolovaná del(5q) je hlavním určujícím znakem podtypu MDS dříve označovaného jako 5q- syndrom.

Na základě těchto poznatků byl vysloven předpoklad, že jedním ze základních mechanismů uplatňujících se při vzniku a progresi MDS je genomová nestabilita, definovaná jako stav, při kterém jsou buňky náchylné ke vzniku a akumulaci genetických změn a současně nejsou schopny na poškození své DNA adekvátně reagovat. Tento stav může být zapříčiněn jednak nadměrným počtem událostí poškozujících DNA jednak poruchami v mechanismech odpovědi na poškození DNA (DNA damage response – DDR) a opravy poškozené DNA (DNA repair) (Zhou T. et al., 2013; Zhou T. et al., 2015). Hypotézu genomické nestability a jejího vlivu na vznik MDS podporuje také fakt, že mutace v genu *TP53*, tedy jednoho z hlavních faktorů mechanismu DDR, mají jednu z nejvyšších incidencí mezi somatickými mutacemi u MDS a současně jsou mutace v tomto genu spojeny s negativním vlivem na celkové přežití nemocných s MDS (Jädersten M. et al., 2011; Kulasekararaj A.G. et al., 2012).

Rolí DNA reparačních mechanismů a odpovědi na poškození DNA v patogenezi MDS se ve své práci zabývala Jankowska, která ukázala zvýšenou frekvenci oxidativního poškození DNA u významného procenta pacientů s MDS a současně pozorovala spojitost mezi tímto typem poškození a přítomností specifické varianty genu *hOOG1*, a to zvláště u nemocných s pokročilými formami MDS (Jankowska A.M. et al., 2008). Studie japonských autorů předpokládá spojení mezi mutacemi v C-konci genu *RUNX1* a útlumem mechanismu DDR u nemocných s myeloidními malignitami (Satoh Y. et al., 2012) a Kefala se svým týmem určil zvýšenou expresi fosforylovaného proteinu NBS1, klíčového regulátoru odpovědi na poškození DNA, jako negativní prognostický faktor pro celkové přežití pacientů s MDS (Kefala M. et al., 2013).

O přítomnosti genetických variant, či mutací, v genech DNA reparace u myeloidních malignit máme pouze omezené množství informací. Problematikou polymorfismů v genech DNA reparace se ve svých pracích zabýval Ribeiro (Ribeiro H.L. Jr. et al., 2015; Ribeiro H.L. Jr. et al., 2016), v nedávné době byly také popsány polymorfismy v DNA reparačních genech u Xeroderma pigmentosum, jednoho z hereditárních onemocnění asociovaných s rizikem vzniku MDS (Santiago S.P. et al., 2017), a byl studován vztah polymorfismů v genech *XPB* (Lys751Gln) a *XRCC1* (Arg280His) ke vzniku MDS (Joshi D. et al., 2016). Na poli výzkumu AML publikoval Seedhouse pozorování, že kombinace polymorfismů v genech *RAD51* (G135C) a *XRCC3* (Thr241Met) je spojena se zvýšeným rizikem vzniku postterapeutické AML (Seedhouse C. et al., 2004). Poznatky o vlivu polymorfismů genu *XRCC1* na snížení schopnosti reparace DNA publikoval ve svém článku Wang (Wang Y et al., 2003).

Úlohou mechanismů opravy DNA se ve svém výzkumu dlouhodobě zabývá také doktora Belíčková, vedoucí laboratoře genomiky Ústavu hematologie a krevní transfuze. Ve svých člancích popsala asociace mezi některými genetickými variantami v DNA reparačních mechanismech a zvýšeným rizikem vzniku MDS u pacientů v české populaci (Belickova M. et al., 2013) a zabývala se také vztahem mezi variantní alelickou frekvencí v mutacích genu *TP53* na celkové přežití pacientů s nízké rizikovým MDS (Belickova M. et al., 2016).

1.1.3 Klasifikace a prognóza

Jak již naznačuje definice, MDS zahrnuje celou řadu podtypů, s často velmi odlišnými projevy a biologickým chováním. Snahou kliniků tedy již od počátku bylo myelodysplastické syndromy podrobněji klasifikovat, na základě výsledků vyšetření zhodnotit prognózu nemocných a adekvátně upravit intenzitu terapie.

Prvním klasifikačním systémem MDS byla takzvaná FAB klasifikace publikovaná francouzskými, americkými a britskými autory v roce 1982 (Bennett J.M. et al., 1982). Tato klasifikace vycházela z morfologického vyšetření periferní krve (PK) a kostní dřeně a definovala pět základních jednotek v rámci MDS: refrakterní anémie (RA), refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS), refrakterní anémie s excesem/nadbytkem blastů (RAEB), refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci (do akutní leukemie) (RAEB-T) a chronická myelomonocytární leukemie (CMML). Diagnostická kritéria těchto klinických jednotek uvádí tabulka 1.2.

Tabulka 1.2 FAB klasifikace MDS (upraveno podle Bennett J.M. et al., 1982).

Kategorie	Dysplazie	blasty v PK	blasty v KD
RA	Erytroidní	< 1 %	< 5 %
RARS	Erytroidní	< 1 %	< 5 %
RAEB	2 a více linií	0–4 %	5–20 %
RAEB-T	Obvykle 2 a více linií	≥ 5 %	20–30 %
CMML	Variabilní	> 1×10^9 /l monocytů	< 20 %

Nová klasifikace dle kritérií WHO byla přijata v roce 2001 a revidována v roce 2008. Zavedla zcela novou klinickou jednotku refrakterní cytopenie s dysplazií ve více řadách (RCMD) a snížila diagnostické kritérium pro AML na 20 % myeloidních blastů v kostní dřeni. Současně vyčlenila specifický fenotyp s izolovanou delecí 5q do takzvaného 5q-syndromu. CMML byla touto klasifikací přesunuta do nově vytvořené kategorie myelodysplastických/myeloproliferativních onemocnění (MDS/MPN). Klasifikace MDS dle WHO 2008 (Swerdlow S.H. et al., 2008), zobrazená v tabulce 1.3, byla platná a široce používaná v průběhu většiny doby, po kterou vznikala tato práce, a proto ji pro klasifikaci MDS v této práci používáme. Nejnovější revize WHO klasifikace pochází z roku 2016 (tabulka 1.4) a mění názvy klinických jednotek nahrazením již obsolentního termínu „refrakterní anémie“ termínem „myelodysplastický syndrom“ (Arber D.A. et al., 2016).

Tabulka 1.3 Klasifikace MDS dle WHO 2008 (Swerdlow S.H. et al., 2008; upraveno podle Bělohávková P., Červinek L., 2014).

WHO jednotka	Dysplazie	blasty v PK	blasty v KD
RA (refr. anémie) RN (refr. neutropenie) RT (refr. trombopenie)	Dyerytropoeza Dysgranulopoeza Dystrombopoeza	< 1 %	< 5 %
RARS	Dyserytropoeza	Nepřítomny	< 5 %, ≥ 15 % prstenčitých sideroblastů
RCMD	2–3 řady	< 1 %	< 5 %
RAEB-1	1–3 řady	< 5 %	5–10 %
RAEB-2	1–3 řady	5–19 %, Auerovy tyče	10–19 % Auerovy tyče
MDS-U (neklasifikovaný)	1 řada	< 1 %	< 5 %
Izolovaná del(5q)	Dyserytropoeza	< 1 %	< 5 %

Tabulka 1.4 Klasifikace MDS dle WHO 2016 (Swerdlow S.H. et al., 2008; upraveno podle Bělohávková P., Červínek L., 2018).

WHO jednotka	Dysplastické linie	Počet cytopenií	Prstenčité sideroblasty	Blasty v PK a v KD	Cytogenetika
MDS-SLD	1	1 nebo 2	< 15 % < 5 %*	KD < 5 % PK < 1 %	Jakákoliv, kromě del(5q)
MDS-MLD	2 nebo 3	1–3	< 15 % < 5 %*	KD < 5 % PK < 1 %	Jakákoliv, kromě del(5q)
MDS-RS-SLD	1	1 nebo 2	≥ 15 % ≥ 5 %*	KD < 5 % PK < 1 %	Jakákoliv, kromě del(5q)
MDS-RS-MLD	2 nebo 3	1–3	≥ 15 % ≥ 5 %*	KD < 5 % PK < 1 %	Jakákoliv, kromě del(5q)
MDS s izolovanou del(5q)	1–3	1–2	ne	KD < 5 % PK < 1 %	Del(5q) izol. ± 1 další změna
MDS-EB1	0–3	1–3	ne	KD 5–9 % PK 2–4 %	Jakákoliv
MDS-EB2	0–3	1–3	ne	KD 10–19 % PK 5–19 % Auerova tyč	Jakákoliv
MDS-U s 1 % blastů s 1 linií dysplazie dle cytogenetiky	1–3 1	1–3 3	ne ne < 15 %	<i>U všech typů:</i> KD < 5 % PK = 1 %	Jakákoliv Jakákoliv Typická pro MDS
Refrakterní cytopenie u dětí	1–3	1–3	ne	KD < 5 % PK < 2 %	Jakákoliv

Cytopenie je definována jako: hemoglobin < 100 g/l, trombocyty < 100x10⁹/l, absolutní počet neutrofilů < 1,8x10⁹/l

*pozitivita *SF3B1* mutace

Ke zpřesnění předpokládané prognózy pacientů byla zavedena řada prognostických systémů. Prvním z nich byl v roce 1997 Mezinárodní prognostický skórovací systém (IPSS), který na základě procenta blastů v kostní dřeni, cytogenetického nálezu a počtu cytopenií

v periferní krvi dělí pacienty do čtyř kategorií: nízkého, středního-1, středního-2 a vysokého rizika. Tento prognostický systém zobrazuje tabulka 1.5 (Greenberg P. et al., 1997).

Tabulka 1.5 Prognostický systém IPSS (Greenberg P. et al., 1997).

Proměnná	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Blasty v KD (%)	< 5	5 - 10	–	11–20	21–30
Karyotyp	Příznivý	Intermediární	Nepříznivý	–	–
Cytopenie	0/1	2/3	–	–	–

Příznivý karyotyp: normální, -Y, del(5q), del(20q); Intermediární karyotyp: ostatní abnormality; Nepříznivý karyotyp: komplexní (≥ 3 abnormality, abnormality chromozomu 7)

Nízké riziko	0 bodů
Střední-1 riziko	0,5–1,0 bodu
Střední-2 riziko	1,5–2,0 bodu
Vysoké riziko	$\geq 2,5$ bodu

Revizí systému IPSS vznikl v roce 2012 Revidovaný mezinárodní prognostický systém (IPSS-R), který klade větší důraz na cytogenetický nálezn a hloubku jednotlivých cytopenií. Tento v současnosti nejvíce užívaný prognostický systém shrnuje tabulka 1.6 (Greenberg P. L. et al., 2012). Prognostické rozdělení cytogenetických změn dle IPSS-R zachycuje tabulka 1.7 (Schanz et al., 2012)

Tabulka 1.6 Revidovaný prognostický systém IPSS-R (Greenberg P. L. et al., 2012).

Proměnná	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cytogenetika	Very good		Good		Intermediate	Poor	Very poor
Blasty v KD (%)	≤ 2		$> 2 - < 5$		5 –10	> 10	
Hemoglobin (g/l)	≥ 100		80 – < 100	< 80			
Trombocyty ($\times 10^9/l$)	≥ 100	50 – < 100	< 50				
Neutrofily ($\times 10^9/l$)	$\geq 0,8$	< 0,8					

Velmi nízké riziko	$\leq 1,5$ bodu
Nízké riziko	$> 1,5 - 3$ body
Intermediární riziko	$> 3 - 4,5$ bodu
Vysoké riziko	$> 4,5 - 6$ bodů
Velmi vysoké riziko	> 6 bodů

Tabulka 1.7 Cytogenetické kategorie dle systému IPSS-R (Schanz J, et al., 2011)

Velmi dobrá: del(11q), -Y
Dobrá: normální karyotyp, del(5q), del(12p), del(20q)
Intermediární: del(7q), +8, i(17q), +19, jiná samostatná změna nebo dvě změny karyotypu
Špatná: -7, der(3q), dvojitá změna zahrnující -7/del(7q), komplexní karyotyp (3 abnormality)
Velmi špatná: komplexní karyotyp s více než 3 změnami

V současné době panuje snaha o určení diagnostické a prognostické hodnoty somatických mutací nacházených u MDS a přesnější stratifikace nemocných na základě myeloidních mutací přítomných v jejich genomu. Mutace *SF3B1* již byla zahrnuta do diagnostických kritérií v rámci 2016 WHO klasifikace a je velmi pravděpodobné, že nejčastější mutace nacházené u nemocných s MDS budou zahrnuty do příštího prognostického systému (Nazha A. et al., 2016).

1.1.4 Klinické projevy

Klinické projevy myelodysplastického syndromu jsou podobně jako u jiných hematologických malignit nespecifické a vyplývají z cytopenií v periferní krvi. Nejčastější cytopenií u MDS je postupně progredující anemie manifestující se u pacientů anemickým syndromem se ztrátou výkonnosti, námahovou dušností, únavou a nesoustředěností. Neutropenie může vést k opakovaným a obtížně léčitelným infekcím, často nedostatečně reagujících na antibiotickou terapii, častým místem infekcí jsou zejména horní cesty dýchací a urogenitální trakt. Trombocytopenie je spojena s typickými projevy hemoragické diatézy se snadnou tvorbou hematomů, sufúzí a petechií, může být přítomno slizniční krvácení, typicky z dásní nebo v podobě epistaxe.

1.1.5 Diagnostika

Základním vyšetřením k určení diagnózy MDS je vyšetření krevního obrazu s mikroskopickým diferenciálním rozpočtem leukocytů. V časně fázi MDS nacházíme nejčastěji makrocytární, či normocytní anémii, většinou pouze nevýznamnou leukopenii s granulocytopenií a různě hlubokou trombocytopenií. U pokročilých forem onemocnění dochází k vyplavování mladších elementů hematopoézy a v periferní krvi nacházíme myeloidní blasty. Stěžejním vyšetřením pro diagnózu MDS je aspirace kostní dřeně spojená s trepanobiopsií. V aspirátu nalézáme různě dysplastickou hematopoézu, u pokročilých forem se zmnoženými myeloidními blasty, cytochemické vyšetření odhalí přítomnost prstenčitých sideroblastů, které jsou typické zejména pro MDS RARS (kritériem pro tuto diagnózu je dle WHO klasifikace je přítomnost $> 15\%$ prstenčitých sideroblastů). Trepanobiopsické vyšetření je nedílnou součástí diagnostiky MDS a vypovídá o možné fibróze v kostní dřeni a případné patologické lokalizaci hematopoetických prekursorů (tzv. ALIP fenomén). Cytogenetické vyšetření aspirátu kostní dřeně, včetně metody fluorescenční in-situ hybridizace (FISH), hraje taktéž zásadní roli v diagnostice MDS a významně přispívá k určení prognózy onemocnění. I když není pro tuto diagnózu stěžejním vyšetřením, má své místo v diagnostice MDS taktéž průtoková cytometrie. Mimo detekce odlišné exprese povrchových buněčných markerů je vhodná k hodnocení počtu myeloidních blastů a taktéž diagnostice možné přítomnosti PNH klonu u nemocných s MDS. V poslední době se nabývá na významu vyšetření molekulárně genetické schopné detekovat přítomnost mutací nejen v genu *TP53*, ale taktéž v celém širokém panelu typicky mutovaných genů. Velikost těchto mutací může být navíc v čase monitorována a pomáhat tak k odhalení ztráty odpovědi na terapii či hrozícího relapsu.

1.1.6 Přehled terapie

Terapeutický přístup je odlišný u případů MDS s nízkým rizikem a případů MDS vysokého rizika. Vzhledem k primárně teoretickému zaměření práce zmiňuji terapii jen v přehledové, stručné formě. Přehled terapie vychází z doporučení České hematologické společnosti (Mayer J., et al., 2016).

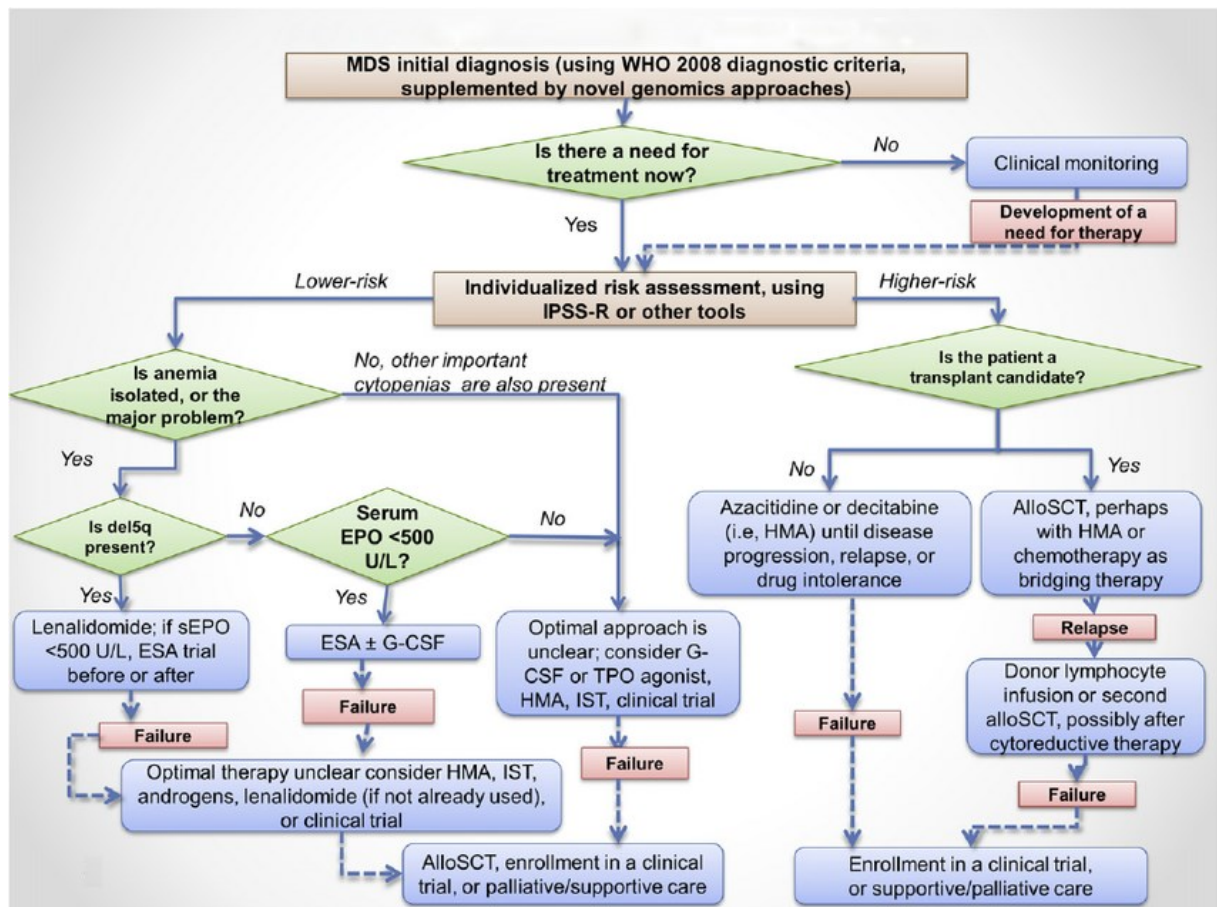
Dle doporučení České hematologické společnosti je možné pacienty s nezávažnou cytopenií, bez transfuzní dependence a se stabilní chorobou pouze observovat. Jelikož je nejčastějším projevem MDS nízkého rizika anémie a s ní spojené obtíže, je terapie této skupiny MDS zaměřena zejména na zvládnutí anémie a jejích symptomů. Transfuze erytrocytů je nedílnou součástí podpůrné terapie a její indikace vychází z aktuální hladiny hemoglobinu, komorbidit a tolerance anémie u pacienta. U polytransfundovaných pacientů je

současně nutno co nejdříve začít s chelatační terapií. Nemocní s nízkou hladinou sérového erythropoetinu mohou být úspěšně léčeni substitucí erythropoetinem. Lékem volby pro anemické pacienty s izolovanou delecí 5q- je lenalidomid podávaný v třítydenních cyklech v nejvyšší tolerované dávce. U pečlivě vybraných pacientů se může s efektem uplatnit také imunosupresivní terapie.

Léčba MDS vysokého rizika má za cíl zejména maximální prodloužení celkové délky života nemocných při zachování co nejvyšší kvality života. Vzhledem k mediánu věku při diagnóze je pouze malá část pacientů únosná k provedení alogenní transplantace krvetvorby, spíše, než věk je v indikaci transplantace nutno zohlednit biologické stáří pacienta a zásadní komorbidity. Lepších výsledků je, za cenu vyšší toxicity léčby, dosahováno po použití myeloablativních přípravných režimů, úspěšnost transplantace po nemyeloablativních přípravných režimech je limitována vysokým počtem relapsů (Martino R, et al., 2006; Parker J.E, et al., 2002). U pacientů s více než 10 % blastů v kostní dřeni, indikovaných k alogenní transplantaci, je úspěšnost transplantace významně zlepšena předlěčením vysokodávkovanou chemoterapií kombinace antracyklinu a cytosinarabinosidu v režimu 3 + 7 nelišícím se od režimu používaného u akutní myeloidní leukemie. Nemocní s pokročilým MDS, kteří nejsou schopni transplantace, jsou kandidáty léčby hypometylačními látkami azacitidinem a decitabinem. Terapie azacitidinem spočívá v cyklickém podávání preparátu po dobu sedmi dní s hodnocením odpovědi na terapii po 4 čtyřtydenních cyklech. U pacientů odpovídajících na léčbu, tedy minimálně se stabilizací choroby a dobrým klinickým stavem (Mayer J., et al., 2016) je možné pokračovat až do progresu onemocnění. Méně úspěšnou alternativou podávání hypometylačních látek je terapie nízkými dávkami cytosinarabinosidu.

Mimo tyto doporučené postupy je možno nemocné s nízkým i vysokým rizikem zařadit také do řady probíhajících klinických studií. Algoritmus terapeutických postupů u MDS shrnuje obrázek 1.2.

Obrázek 1.2 Algoritmus terapie MDS podle předních amerických odborníků na problematiku tohoto onemocnění (Bejar R., Steensma D., 2014).



1.2. Buněčné dráhy DNA reparačních mechanismů

1.2.1 Úvod

Denně dochází v jediné buňce k desítkám událostí poškozujících genetickou informaci obsaženou v DNA (Lindahl T., Barnes D.E, 2000), tato poškození přitom ovlivňují chod základních buněčných procesů, jako jsou replikace, transkripce a translace, a tedy dochází k celkovému ohrožení funkčnosti a životaschopnosti buňky. Buňky proto byly nuceny již v počátku evoluce vyvinout schopnost opravy poškozené DNA, ta je vykonávána skrze DNA reparační mechanismy, definované jako buněčné dráhy mající schopnost detekovat a opravit poškození DNA (Dexheimer T.S., 2013). DNA reparační mechanismy tedy umožňují zachování stability DNA, podílí se na správné funkci buněk včetně buněčného cyklu a dělení a brání vzniku mutací a malignímu zvratu buněk.

1.2.2 Zdroje poškození DNA a rozdělení DNA reparačních mechanismů

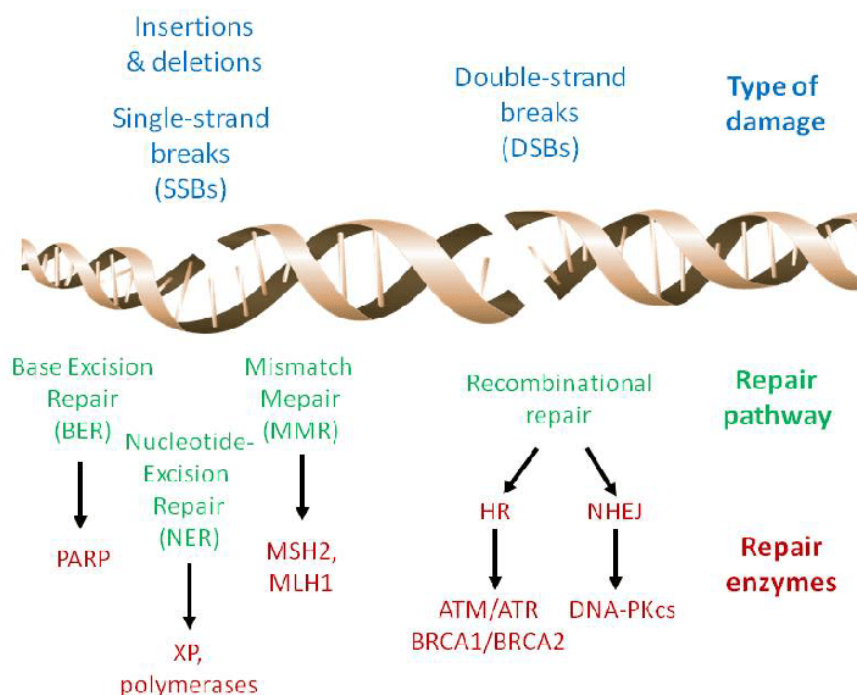
Zdroje poškození DNA mohou být obecně rozděleny na vnitřní (endogenní), které převažují a vnější (exogenní). Mezi endogenní příčiny poškození DNA řadíme spontánní změny bází (hydrolýza, deaminace), replikační chyby (včetně zařazení pozměněných bází, či uracilu), tautomerizace bází (amino-imino a keto-enol formy bází) způsobující chybné párování A:C a G:T (Fajkus J., Fajkusová L., 2013) působení alkylačních látek (například S-adenosylmethionin) a v neposlední řadě také poškození způsobená produkty buněčného metabolismu jako jsou reaktivní kyslíkové entity (ROS), zejména radikály $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\bullet\text{OH}^-$ (Apel K, Hirt H, 2004) a reaktivní dusíkaté entity (RNS) reprezentované radikálem $\bullet\text{NO}$ (Burney S. et al, 1999). Exogenní příčiny poškození DNA (neboli mutageny) lze rozdělit na fyzikální (UV a ionizující záření), chemické (N-nitrosaminy, polycyklické aromatické uhlovodíky, chemoterapeutika) a biologické (viry a plísňe) (Dexheimer T.S., 2013).

Rozlišujeme pět základních mechanismů opravy DNA, z nichž každý se specializuje na opravy odlišných typů poškození molekuly DNA.

1. Oprava vyštěpením báze (Base excision repair – BER)
2. Oprava vyštěpením nukleotidu (Nucleotide excision repair – NER)
3. Oprava chybného párování bází (Mismatch repair – MMR)
4. Oprava homologní rekombinací (Homologous recombination – HR)
5. Nehomologní spojování konců (Non-homologous end-joining – NHEJ)

Schematické zobrazení těchto základních mechanismů a hlavních typů opravovaných poškození shrnuje obrázek 1.2.

Obrázek 1.2 Přehled typů poškození DNA, reparačních drah a hlavních reparačních enzymů (Toss A., Cortesi L., 2013).

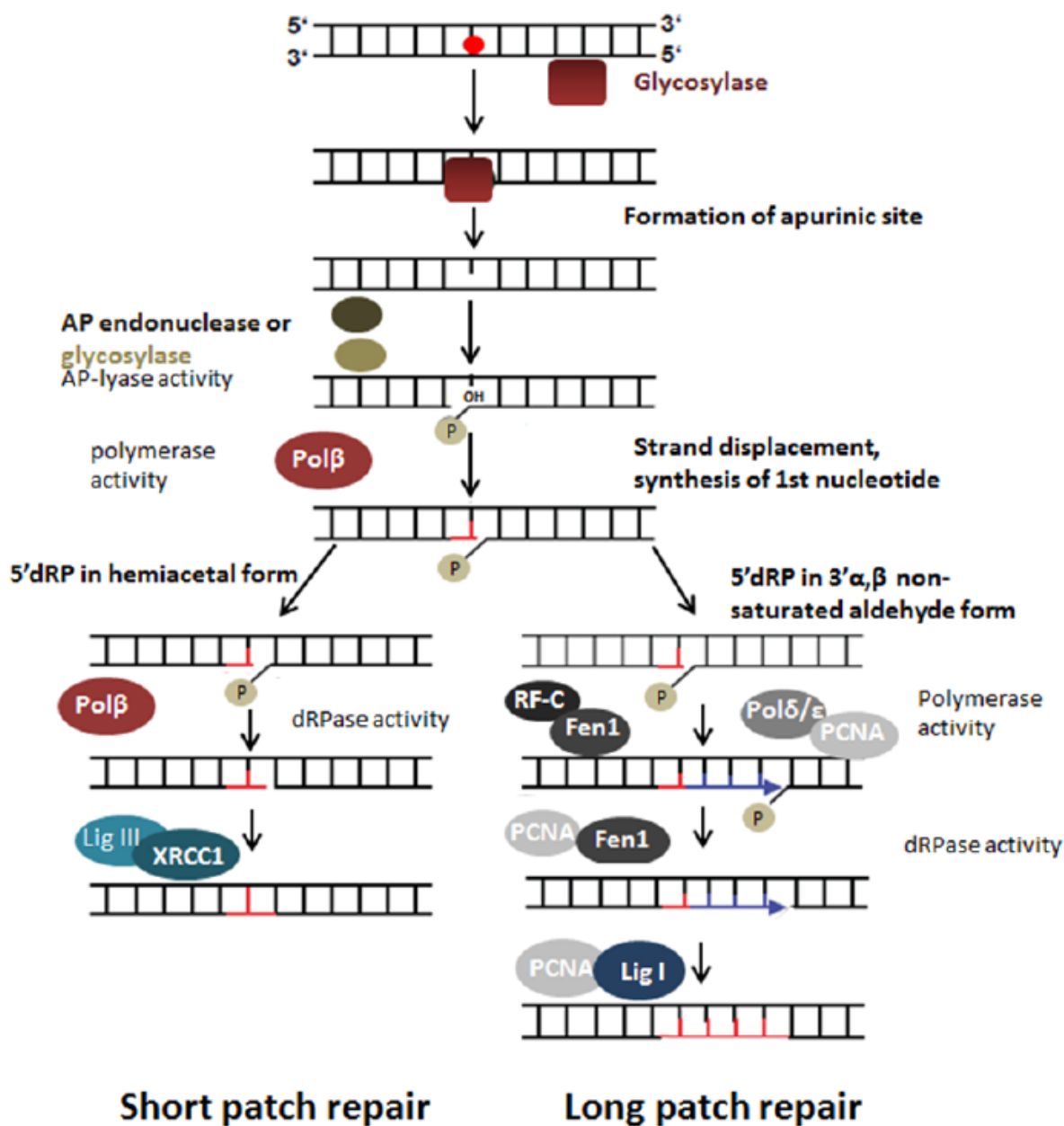


1.2.3 Base excision repair

Mechanismus opravy vyštěpením báze slouží zejména k opravě bází poškozených hydrolýzou, deaminací nebo jinými mechanismy a také k opravě jednořetězcových zlomů DNA. Stejně jako u ostatních mechanismů DNA reparace se jedná o koordinovaný proces následných enzymatických reakcí (Zharkov D.O., 2008).

Oprava začíná vyštěpením poškozené báze některou z DNA glykosyláz za vzniku AP místa (apurinic/apyrimidinic site). Dosud bylo popsáno více, než 12 různých DNA glykosyláz specializovaných dle druhu báze a typu poškození (Jacobs A.L., Schar P., 2012). V dalším kroku poté dochází k hydrolýze cukr-fosfátové páteře DNA na 5' konci před AP místem endonukleázou APE1. Následně dochází k přidání jednoho nukleotidu DNA a odštěpení 5-deoxyribózafosfátu DNA polymerázou β . Tento takzvaný short-patch BER (patch = záplata) tvoří 80–90 % všech oprav. Dle templátu může také být přidáno více nukleotidů DNA polymerázou δ nebo ϵ s následným odštěpením vzniklého volného řetězce „flap“ endonukleázou FEN1, long-patch BER, jak se tento alternativní mechanismus označuje, je zodpovědný za 10 % oprav. Reparace systémem BER je ukončena ligací konců molekuly DNA ligázou I nebo komplexem DNA ligáza III + XRCC1. Schéma reparace mechanismem BER zachycuje obrázek 1.3.

Obrázek 1.3 Oprava DNA systémem base excision repair (BER), podle (Leyns L., Gonzales L., 2012). Popis viz předchozí text.



1.2.4 Nucleotide excision repair

Mechanismus opravy vyštěpením nukleotidu slouží ke korekci větších poškození narušujících dvouřetězcové uspořádání molekuly DNA (Shuck SC et al., 2008). Takové poškození může být způsobeno polycyklickými aromatickými uhlovodíky nebo nitrosaminy, dále jsou systémem opravována poškození DNA vznikající vlivem ultrafialového záření, tedy UV zářením indukované dimery thyminu a 6-4 fotoprodukty. Samotný průběh NER je

podobný předchozímu systému, ale komplexnější, zahrnuje asi 30 různých proteinů (Costa R.M., et al., 2003).

V rámci mechanismu NER lze rozlišit dva způsoby detekce poškození DNA. První způsob se uplatňuje u takzvaného celogenomového NER (global genome NER). Detekce poškození se děje prostřednictvím proteinového komplexu XPC + Rad23 homolog B + Centrin-2 (Sugasawa K, et al., 1998), větší afinitu proteinu XPC k UV produktům zajišťuje rozvolněním DNA v místě poškození protein XPE. Druhý způsob detekce poškození je vázán na transkripci (transcription-coupled NER), kdy je poškození detekováno RNA polymerázou II a dochází k zastavení transkripce. To je signálem pro navázání proteinů CSA a CSB, které uvolní polymerázu a umožní dalším proteinům opravit poškození (Hanawalt P.C., Spivak G., 2008).

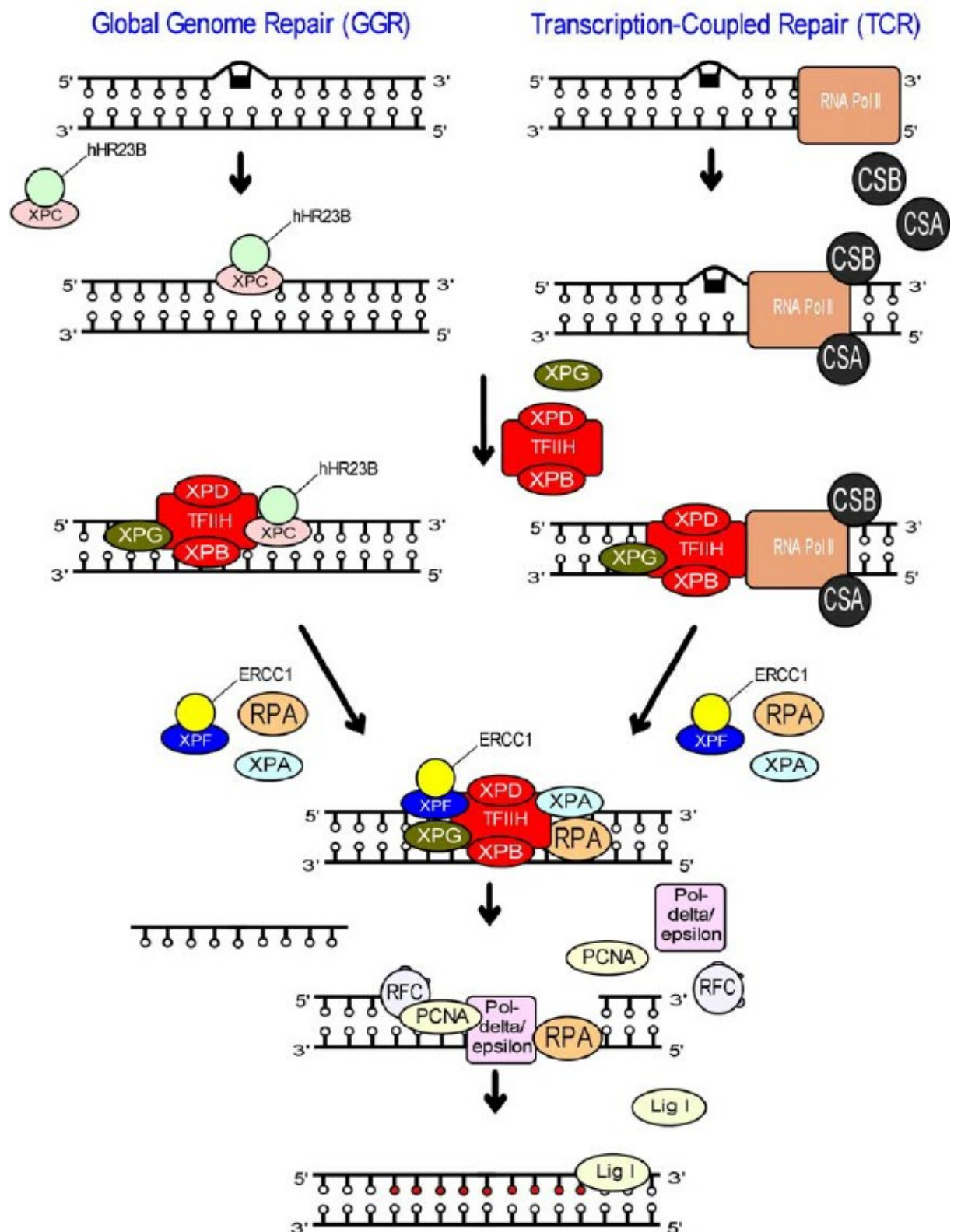
Další oprava poškození je již společná pro oba systémy NER. Navázání transkripčního faktoru TFIIH a helikáz XPB a XPD vede k rozvolnění DNA a vytvoření asi 30nukleotidové bubliny kolem poškození. Následně je navázáním proteinů XPA a RPA vytvořen a stabilizován takzvaný preincizní komplex a endonukleázami XPF a XPG dochází k vystřížení úseku DNA obsahujícího poškození (Dexheimer T.S., 2013). Schéma opravy systémem NER zachycuje obrázek 1.4.

1.2.5 Mismatch repair

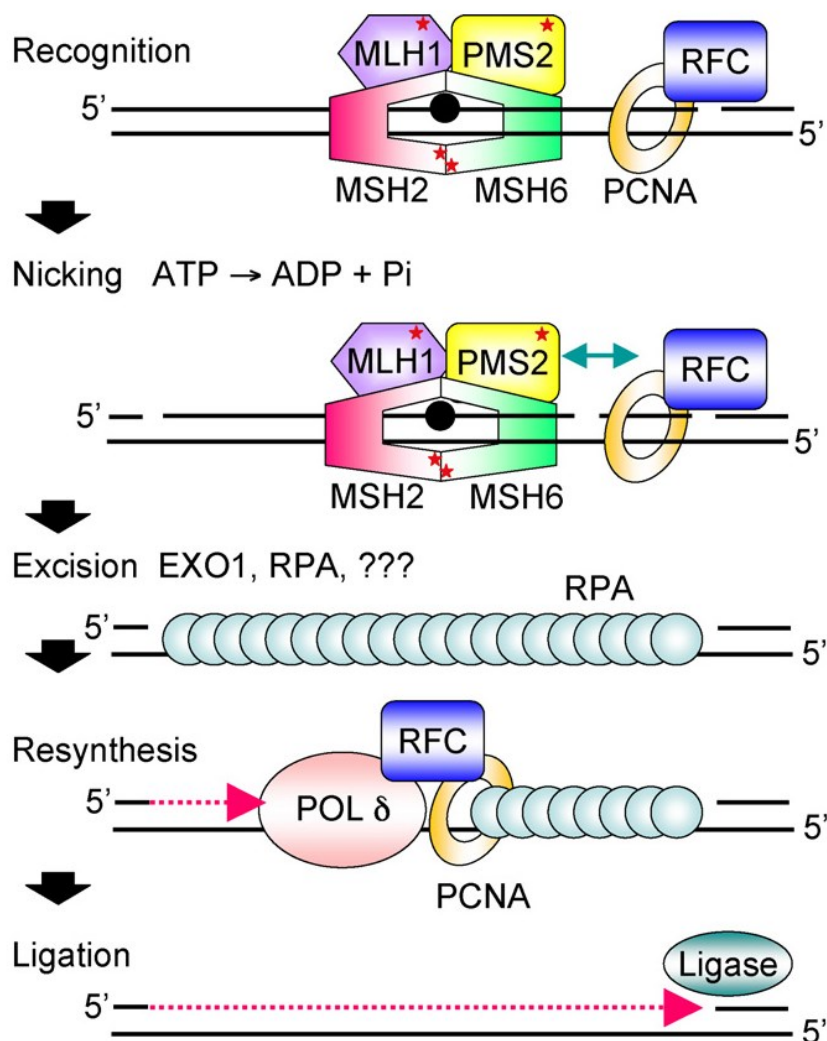
Oprava chybného párování bází, neboli mismatch repair slouží k postreplikační opravě chybně začleněných bází, které unikly kontrolní aktivitě replikačních DNA polymeráz, dále také opravuje inserční nebo deleční smyčky, které vznikly sklouznutím replikační polymerázy při replikaci repetitivních sekvencí DNA (Li G.M., 2008; Dexheimer T.S., 2013).

Průběh mismatch repair lze ve stručnosti shrnout následovně. Nejdříve dochází k rozpoznání chybně párovaných bází komplexem MSH2-MSH6 (MutS α), méně častý komplex MutS β rozpoznává velké inserce a delece. Následně dochází k navázání komplexu MLH1-PMS2 (MutL α) s endonukleázovou aktivitou a ATP-dependentnímu rozštěpení řetězce endonukleázou za účasti proteinů PCNA a RFC, toto štěpení může probíhat i ve značné vzdálenosti od místa chybného párování. Řetězce obsahujícího chybně párovanou bázi je degradován exonukleázou EXO1 a vzniklá mezera je doplněna DNA polymerázou δ . Oprava je dokončena ligací nově vytvořeného úseku DNA ligázou I. Schematické znázornění výše popsaného mechanismu přináší obrázek 1.5.

Obrázek 1.4 Oprava DNA systémem nucleotide excision repair (NER) s vyznačením obou typů detekce poškození (Olsen A.K., et al., 2005). Popis viz předchozí text.



Obrázek 1.5 Schematické zobrazení opravy chybného párování bází (Hsieh P., Yamane K., 2008). Popis mechanismu je uveden v předchozím textu.



1.2.6 Dvouřetězcové zlomy DNA

Dvouřetězcové zlomy jsou nejzávažnějším a nejnebezpečnějším typem poškození molekuly DNA. Neopravený dvouřetězcový zlom může vést ke smrti buňky nebo ke vzniku chromozomových aberací jako jsou inverze či translokace chromozomů, a současně nepřesná oprava takovýchto zlomů může mít za následek vznik delece nebo inserce bází (van Gent D.C. et al., 2001; Dexheimer T.S., 2013). Dvouřetězcové zlomy v molekule DNA vznikají působením různých agens, jako jsou chemické mutageny, ionizující záření, ROS a jiné. K opravě těchto poškození jsou v buňce určeny dva reparační systémy, oprava homologní rekombinací a nehomologní spojování konců.

1.2.7 Oprava homologní rekombinací

Pro svou funkci vyžaduje templátovou DNA sesterské chromatidy, uplatňuje se tedy až po replikaci DNA v S a G2 fázi buněčného cyklu. Je to velmi přesný mechanismus opravy, který opravuje dvouřetězcové zlomy bez vytváření mutací. Průběh lze rozdělit na tři fáze dle časového vztahu ke vzájemnému spojení obou chromatid – presynapse, synapse a postsynapse.

Po detekci zlomu dochází k úpravě jeho konců odstraněním bází ve směru $5' \rightarrow 3'$, dochází tak k vytvoření $3'$ jednořetězcových vláken. Tato operace je zajišťována proteinovým komplexem MRN, sestávajícím z proteinů Mre11, Rad50 a Nbs1 (Sartori A.A., et al., 2007). Vzniklá jednořetězcová vlákna DNA jsou stabilizována navázáním proteinu RPA, zamezí se tak prostorovým konformačním změnám jednořetězcového vlákna. Protein RPA je následně nahrazen RAD51 rekombinázou, která se navazuje na DNA spolu s dalšími mediátorovými a pomocnými proteiny (RAD51B/C/D, XRCC2/3, RAD52, BRCA2), vzniká tak nukleoproteinový komplex, který umožní vyhledání homologní sekvence na druhé chromatidě (Forget A. L., Kowalczykowski S.C., 2010). Po nalezení homologní sekvence dochází k vmezeření jednovláknového úseku mezi vlákna sesterské chromatidy a podle templátu je syntetizována DNA od $3'$ konce s následnou ligací. Vzniká čtyřvláknová přechodná struktura označovaná jako Hollidayovo spojení (Holliday junction) (McIlwraith M. J., et al., 2005). Hollidayovo spojení je následně symetricky nebo asymetricky rozděleno endonukleázami. Schematicky tento proces zobrazuje obrázek 1.6.

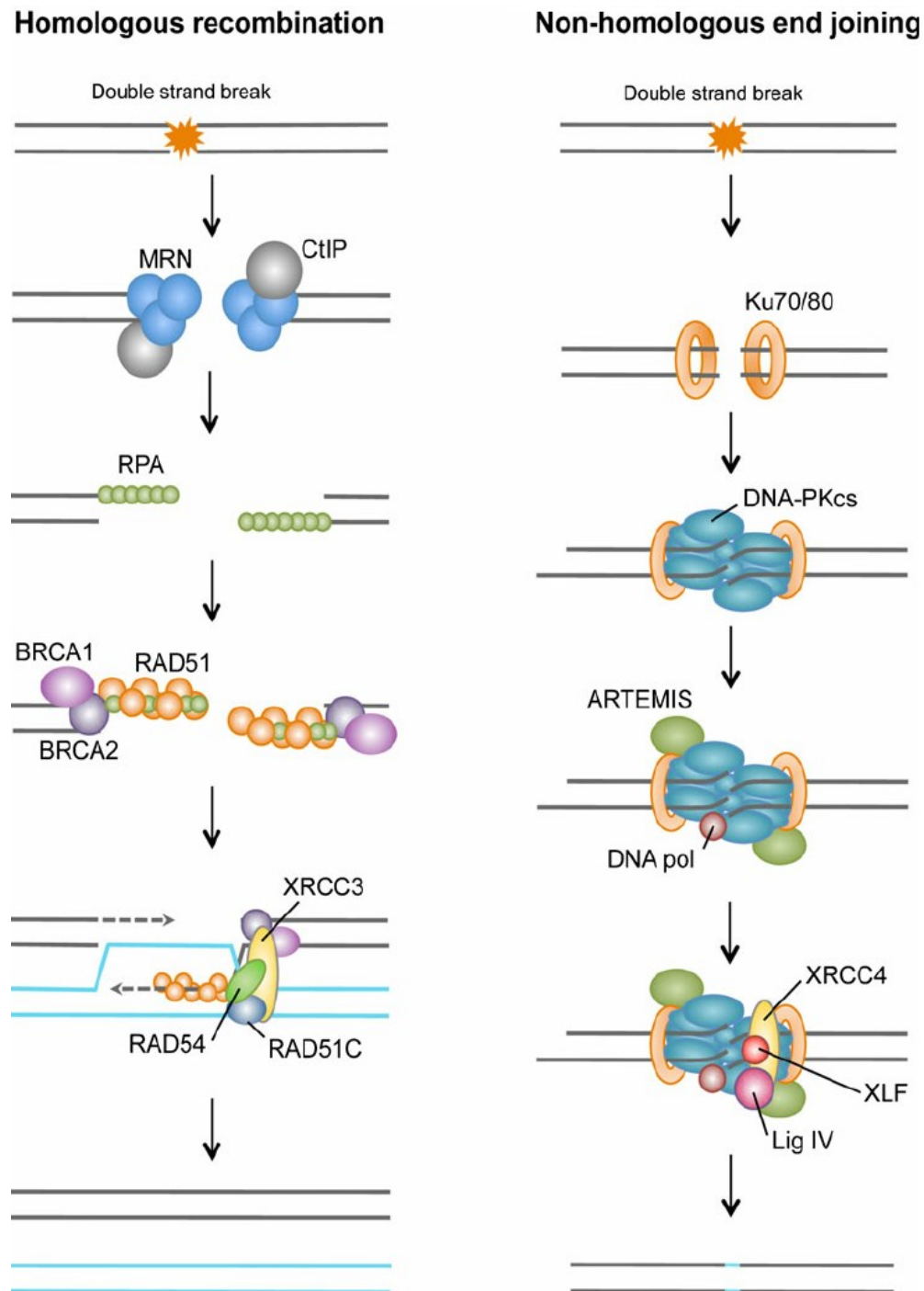
1.2.8 Nehomologní spojování konců

Oprava dvouřetězcových zlomů tímto mechanismem spočívá v přímém spojení konců molekuly DNA v místě zlomu, proces nevyžaduje templátovou DNA a může proto být použit po celou délku buněčného cyklu. Významnou nevýhodou je ale nízká přesnost, kdy hrozí ztráta genetického materiálu a vznik delecí, nebo naopak nadměrné přidávání bází a vznik inzercí.

Po detekci přerušení obou řetězců DNA dojde k navázání heterodimeru Ku70/Ku80 na oba konce zlomu, Ku dimer přitom zaujímá cyklický tvar a obkružuje obě vlákna DNA (Walker J.R., et al., 2001). Nukleoproteinový komplex Ku-DNA katalyzuje navázání a aktivaci DNA-proteinkinázy a následně dochází k úpravě vláken DNA na obou koncích zlomu, to se děje a) přidáním chybějících nukleotidů DNA podle komplementarity DNA polymerázami μ a λ s rizikem inserce nebo b) odštěpení jednovláknových přesahů nukleázou Artemis s rizikem delece. Takto upravené konce zlomu DNA jsou nakonec spojeny DNA

ligázou IV v komplexu s proteinem XRCC4 (Ahnesorg P, et al., 2006). Mechanismus je znázorněn na obrázku 1.6.

Obrázek 1.6 Oprava dvouřetězcových zlomů DNA se srovnáním obou hlavních mechanismů, přesná homologní rekombinace s potřebou templátové DNA proti jednoduchému nehomolognímu spojení konců s rizikem vzniku mutace (Brochier C., Langley B., 2013).



2. Cíle práce a výchozí hypotézy

Nedávné studie předních vědeckých týmů zabývajících se výzkumem myelodysplastického syndromu popsaly u MDS přítomnost souboru mutací, obecně označovaných jako myeloidní mutace. Současně bylo také prokázáno, že alespoň jedna z těchto mutací je přítomna u většiny případů tohoto hematologického onemocnění. Již delší dobu je také známo, že MDS je velmi často spojen s chromozomálními abnormalitami v rozsahu od izolovaných aberací až ke komplexním změnám karyotypu. Oba tyto faktory naznačují značnou míru nestability genetické informace v hematopoetických kmenových buňkách pacientů s MDS. K této genetické nestabilitě pravděpodobně přispívá abnormální funkce mechanismu reparace buněčné DNA, která může být jak příčinou, tak následkem maligní transformace hematopoetické buňky.

Cílem práce bylo prokázat zmíněnou abnormalitu ve fungování DNA reparačních mechanismů u nemocných s diagnózou MDS a pokusit se objasnit, jakou roli hraje porušená oprava DNA v patogenezi tohoto onemocnění.

Práce byla rozdělena na dvě relativně nezávislé části podle základních použitých metodik, jejichž dílčími cíli bylo:

- a) hodnocení exprese klíčových genů DNA reparace u nemocných s MDS a případných změn této exprese v průběhu vývoje choroby
- b) detekce genetických variant (mutací, či polymorfismů) v genech DNA reparace a průkaz jejich souvislosti s rizikem vzniku MDS

Hypotézy, na které se práce snažila odpovědět, byly definovány takto:

- a) Exprese genů DNA reparace je u nemocných s MDS snížena, což vede k nedostatečné opravě poškození DNA v hematopoetické buňce s následkem vzniku a hromadění mutací.
- b) V genech kódujících proteiny účastníci se opravy DNA jsou ve zdravé populaci přítomny polymorfismy, které snižují aktivitu DNA reparace a predisponují tím ke vzniku MDS.

3. Studovaný materiál a použité metody

3.1. Soubor vyšetřovaných pacientů

Vyšetřované vzorky kostní dřeně a periferní krve pacientů s diagnózou MDS byly shromážděny během rutinních klinických vyšetření na Ústavu hematologie a krevní transfuze a I. interní klinice – klinice hematologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Diagnóza MDS a klasifikace pacientů byla určena na základě kritérií klasifikace WHO 2008. Všechny vyšetřované subjekty poskytly informovaný souhlas se zpracováním biologického materiálu k vědeckým účelům a prováděné studie byly schváleny lokální etickou komisí.

Skríningovou kohortu pro hodnocení exprese DNA reparačních genů tvořilo 28 pacientů se všemi podtypy MDS a 4 hematologicky zdravé, věkově odpovídající, kontroly. Validací kohorta sestávala ze 122 pacientů všech subtypů MDS a 12 zdravých, věkově odpovídajících, kontrol. Pro validaci genů *RPA3*, *MPG* a *XPC* sestávala validační kohorta z 84 pacientů a 10 kontrol. Všechny vzorky pacientů byly získány v čase diagnózy. Podrobné charakteristiky vyšetřovaných pacientů uvádí tabulka 3.1. Sériové vzorky 15 pacientů s progredujícím onemocněním byly užity k monitoraci exprese genů *RAD51* a *XRCC2* v průběhu postupující choroby, od každého z těchto nemocných byly vyšetřeny 2 až 4 vzorky. Profil myeloidních mutací byl zjištěn u všech 15 pacientů s progredujícím onemocněním a mutační stav genu *TP53* byl ověřen u všech vyšetřovaných nemocných s MDS nízkého rizika. 3 pacienti s 5q-syndromem, 3 pacienti s RCMD, 2 pacienti s RAEB-1 měli prokázanou mutaci genu *TP53* v době odběru námi hodnocených vzorků. Mutace *TP53* nebyla prokázána u žádného nemocného s RA nebo RARS z naší kohorty pacientů (Belickova M. et al., 2016).

Cílené sekvenování exonových oblastí DNA reparačních genů byla provedeno na vzorku 16 pacientů s MDS vysokého rizika. Validací kohorta určená k ověření možného vztahu vybraných genových polymorfismů ke zvýšené pravděpodobnosti vzniku MDS byla tvořena 200 pacienty s MDS všech podtypů a 216 hematologicky zdravými, věkově odpovídajícími, kontrolami. Charakteristiky vyšetřovaných pacientů jsou uvedeny v tabulce 3.2. Výše zmíněných 16 pacientů, u kterých byla provedena sekvenace, bylo také součástí skríningové kohorty při hodnocení exprese DNA reparačních genů, což u těchto nemocných umožnilo vzájemně srovnávat získaná sekvenační a expresní data.

Tabulka 3.1 Základní charakteristiky pacientů skrínigové a validační kohorty vyšetřovaných k hodnocení exprese DNA reparačních mechanismů. Procento myeloidních blastů v kostní dřeni, hemoglobin, počet neutrofilních granulocytů a trombocytů jsou vyjádřeny ve tvaru medián (rozpětí).

	Skrínigová kohorta	Validační kohorta
Počet pacientů	28	122
Pohlaví (M / Ž)	14 / 14	67 / 55
Medián věku (roky)	65 (39–84)	65 (22–89)
Blasty v kostní dřeni (%)	3,9 (0,2–18,8)	5,4 (0,0–32,8)
Hemoglobin (g/dl)	9,7 (7,7–14,5)	9,4 (4,2–13,9)
Neutrofily (G/l)	1,72 (0,20–11,39)	1,35 (0,06–30,00)
Trombocyty (G/l)	173 (36–597)	120 (6–797)
Diagnóza		
RA	2 (7 %)	4 (3 %)
RARS	1 (4 %)	7 (6 %)
5q- syndrom	4 (14 %)	5 (4 %)
RCMD	8 (29 %)	42 (35 %)
RAEB-1	4 (14 %)	15 (12 %)
RAEB-2	9 (32 %)	37 (30 %)
AML s MLD	0 (0 %)	9 (7 %)
CMML	0 (0 %)	2 (2 %)
MDS-U	0 (0 %)	1 (1 %)
IPSS-R		
very low	3 (11 %)	16 (13 %)
low	6 (21 %)	25 (20 %)
intermediate	6 (21 %)	18 (15 %)
high	8 (29 %)	33 (27 %)
very high	5 (18 %)	29 (24 %)
nezjištěno	–	1 (1 %)
Karyotyp dle IPSS-R		
very good / good	13 (47 %)	64 (52 %)
intermediate	9 (32 %)	21 (17 %)
poor / very poor	6 (21 %)	36 (30 %)
nezjištěno	–	1 (1 %)
Počet blastů v KD		
< 2 %	8 (29 %)	28 (23 %)
2–5 %	8 (29 %)	30 (25 %)
5–10 %	3 (11 %)	16 (13 %)
> 10 %	9 (31 %)	48 (39 %)

Tabulka 3.2 Základní charakteristiky skríningové kohorty pacientů vyšetřovaných metodou cíleného sekvenování vybraných DNA reparačních genů a validační kohorta MDS pacientů a kontrol použitá k ověření možné asociace vybraných genových polymorfismů se zvýšenou pravděpodobností vzniku MDS. Procento myeloidních blastů v kostní dřeni, hemoglobin, počet neutrofilních granulocytů a trombocytů jsou vyjádřeny ve tvaru medián (rozpětí).

	Skríningová kohorta	Validační kohorta pacienti	Validační kohorta kontroly
Počet pacientů	16	200	216
Pohlaví (M/Ž)	9/7 (56 %/44 %)	115/85 (58 %/42 %)	110/106 (51 %/49 %)
Medián věku (roky)	65 (39–82)	69 (19–85)	64 (21–98)
Blasty v kostní dřeni (%)	8,4 (0,6–18,8)	4,0 (0,0–60,0)	–
Hemoglobin (g/dl)	9,8 (8,3–13,2)	9,4 (6,5–15,3)	–
Neutrofily (G/l)	0,8 (0,20–11,39)	1,48 (0,08–60,6)	–
Trombocyty (G/l)	120 (36–504)	116 (8–734)	–
Diagnóza			
RA/RN	0 (0 %)	15 (8 %)	
RARS	0 (0 %)	5 (2 %)	
5q- syndrom	0 (0 %)	15 (8 %)	
RCMD	5 (31 %)	68 (34 %)	
RAEB-1	4 (25 %)	20 (10 %)	
RAEB-2	7 (44 %)	46 (23 %)	
AML s MLD	0 (0 %)	20 (10 %)	
CMML	0 (0 %)	11 (5 %)	
IPSS-R			
very low	0 (0 %)	29 (14 %)	
low	1 (6 %)	43 (21 %)	
intermediate	4 (25 %)	45 (23 %)	
high	7 (44 %)	37 (18 %)	
very high	4 (25 %)	22 (11 %)	
nezjištěno	–	24 (12 %)	
Karyotyp dle IPSS-R			
very good / good	4 (25 %)	114 (57 %)	
intermediate	7 (44 %)	40 (20 %)	
poor / very poor	5 (31 %)	24 (12 %)	
nezjištěno	–	22 (11 %)	

3.2. Separace buněk a extrakce RNA

Mononukleární buňky kostní dřeně byly selektovány za použití hustotní gradientové centrifugace Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Mnichov, Německo), CD34⁺ buňky byly následně izolovány magnetickou buněčnou separací použitím přístroje MACS dle instrukcí výrobce (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Německo). Acid-guanidine-fenol-chloroformová metoda (Chomczynski P, Sacchi N., 1987) byla použita k extrakci celkové buněčné RNA a vzorky byly současně inkubovány s DNazou I (Qiagen, Hilden, Německo) k prevenci kontaminace genomickou DNA. Kvalita každého vzorku RNA byla posouzena analyzátozem Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornie, USA).

3.3. PCR v reálném čase (Real-Time PCR)

Panel se zaměřením na studium exprese genů lidské DNA reparace metodou PCR, RT² Profiler PCR – Human DNA Repair Array (Qiagen, Hilden, Německo), obsahující 84 hlavních genů asociovaných s reparací DNA, byl použit dle návodu výrobce. Seznam testovaných genů je uveden v tabulce 3.3. Relativní genová exprese byla vypočtena dle metody $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001) s použitím housekeeping genů *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* a *RPLP0* pro kvantitativní normalizaci.

Následně byla exprese vybraných genů (*RAD51*, *XRCC2*, *RPA3*, *MPG*, *XPC*) hodnocena na vzorcích validační kohorty pacientů za použití TaqMan® esejí (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornie, USA). Tyto validační vzorky byly hodnoceny v duplikátech. RT-PCR byla v obou fázích prováděna na přístroji StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Relativní genová exprese byla vypočtena metodou $2^{-\Delta\Delta CT}$, pro kvantitativní normalizaci byl tentokrát použit samostatně gen *B2M*.

Tabulka 3.3 Seznam 84 DNA reparačních genů, u nichž byla vyšetřována genová exprese pomocí panelu RT² Profiler PCR – Human DNA Repair Array. V další fázi studie bylo u těchto genů provedeno cílené sekvenování jejich exonových oblastí.

Base Excision Repair (BER): APEX1, APEX2, CCNO, LIG3, MPG, MUTYH, NEIL1, NEIL2, NEIL3, NTHL1, OGG1, PARP1, PARP2, PARP3, POLB, SMUG1, TDG, UNG, XRCC1.
Nucleotide Excision Repair (NER): ATXN3, BRIP1, CCNH, CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, LIG1, MMS19, PNKP, POLL, RAD23A, RAD23B, RPA1, RPA3, SLK, XAB2, XPA, XPC.
Mismatch Repair (MMR): MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, PMS1, PMS2, POLD3, TREX1.
Double-Strand Break (DSB) Repair: BRCA1, BRCA2, DMC1, FEN1, LIG4, MRE11A, PRKDC, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51B, RAD51D, RAD52, RAD54L, XRCC2, XRCC3, XRCC4, XRCC5, XRCC6.
Other Genes Related to DNA Repair: ATM, ATR, EXO1, MGMT, RAD18, RFC1, TOP3A, TOP3B, XRCC6BP1.

3.4. Imunohistochemický průkaz proteinu RAD51

Histologické vzorky byly získány standardním postupem trepanobiopsií z pánevní kosti. Získaná tkáň byla odvápněna, fixována formalinem, zabudována do parafínu a následně nakrájena na 3 mikrometry tenké řezy, které byly dále imunohistochemicky zpracovány. K lokalizaci proteinu RAD51 byla použita anti-Rad51 (H-92) králičí polyklonální protilátka zacílená na prvních 92 aminokyselin lidského RAD51 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). Detekce byla provedena za použití sekundární biotinylované protilátky, komplexu streptavidin-peroxidázy a 3,3'-diaminobenzidín-tetrachloridu (LSAB+ Dako REAL Detection System). Celkem bylo imunohistochemicky barveno 12 vzorků, 4 vzorky pacientů s MDS nízkého rizika, 4 vzorky nemocných s MDS vysokého rizika a 4 vzorky pacientů s plasmocytomem jako technické kontroly. Kontrolní vzorky byly připraveny a barveny stejným způsobem jako vzorky nemocných s MDS a prokázaly správnost barvení tkáně pro protein RAD51. Všechny imunohistochemické vzorky byly hodnoceny zkušeným hematopatologem a klasifikovány jako RAD51-negativní, 1+, 2+ nebo 3+ pozitivní. Lokalizace proteinu RAD51 byla hodnocena zvlášť v jádře a zvlášť v cytoplasmě hematopoetických buněk.

3.5. Cílené sekvenování vybraných DNA reparačních genů

S použitím postupů sekvenování nové generace (NGS) byly cíleně sekvenovány (targeted enrichment resequencing) exonové části 84 vybraných genů účastníků se reparací lidské DNA. Soubor sekvenovaných genů byly sestaven ve shodě s geny obsaženými v panelu RT² Profiler PCR – Human DNA Repair Array (Qiagen) použitým při hodnocení exprese genů DNA reparace. Seznam testovaných genů je uveden v tabulce 3.3. Sekvenování bylo provedeno za použití kitu SureSelect XT2 1Kb-499 kb (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA) na platformě Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, Kalifornie, USA). Hloubka pokrytí byla > 300 čtení. Vybrané genetické sekvence byly verifikovány Sangerovým sekvenováním CD3+ T-lymfocytů za účelem určení potenciálního zárodečného původu identifikovaných genových variant (ABI 3500, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornie, USA).

3.6. Validace vybraných jednonukleotidových polymorfismů

U validační kohorty pacientů s diagnózou MDS a kontrol (viz tabulka 3.2) byla provedena genotypizace vybraných jednonukleotidových polymorfismů (SNP) s využitím vhodných TaqMan® SNP esejí (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornie, USA). Genotypizace byla provedena na přístroji StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornie, USA).

3.7. Statistická analýza dat genové exprese

Statistická analýza byla provedena s použitím nástroje GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornie). Všechny p-hodnoty při vzájemném porovnávání dvou skupiny byly vypočítány jako oboustranné použitím neparametrického nepárového (Mann-Whitneyho) testu. V případech vzájemného porovnávání více než dvou skupin byla pro výpočet p-hodnot použita statistika ANOVA. P-hodnota byla považována za statisticky signifikantní při dosažení hodnoty nižší než 0,05. Celkové přežití pacientů bylo definováno jako doba mezi diagnózou a úmrtím z jakékoliv příčiny, přežití žijících pacientů bylo odečteno v čase posledního ambulantního vyšetření. Časové křivky do události, v našem případě křivky celkového přežití, byly vytvořeny s použitím Kaplan-Meierovy metody a statisticky vyhodnoceny užitím log-rank (Mantel-Coxova) testu. Multivariantní analýza používající Coxův regresní model byla vytvořena k určení nezávislého dopadu různých proměnných na celkové přežití nemocných.

3.8. Bioinformatická a statistická analýza sekvenačních dat

Hrubá data získaná cílenou sekvenací exonových částí vybraných genů a referenční korespondující genové sekvence poskytla společnost ATLAS Biolabs GmbH (Berlin, Německo). Pro vizualizaci sekvenačních dat a analýzu výsledků byl využit nástroj Tablet, verze 1.13.12.17 (Milne I. et al., 2013). Software VarSifter verze 1.6 (Teer J.K. et al., 2012) umožnil vizualizaci a katalogizaci poskytnutých seznamů detekovaných genetických variant. Doplnující a aktuální informace k nalezeným variantám byly získány z databází NCBI dbSNP database (Sherry S.T. et al, 2001) a NCBI Variation Viewer. Při vyhledávání v těchto databázích jsme použili referenční genom Homo Sapiens GRCh37.p13. Statistické analýzy byly následně prováděny za použití nástroje GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornie, USA). Potenciální vztah mezi konkrétními genovými polymorfismy a rizikem vzniku MDS byl počítán jako odds ratio (OR), přičemž jako kontrolní skupina soužila data alelických frekvencí v populaci HapMAP-CEU dostupná v databázi NCBI dbSNP. Procentuální hodnoty pro výpočty OR byly vyjádřeny jako celá čísla. Všechny p-hodnoty při vzájemném porovnávání dvou skupin byly vypočítány jako obousměrné použitím neparametrického nepárového (Mann-Whitneyho) testu. V případech vzájemného porovnávání více než dvou skupin byla pro výpočet p-hodnot použita statistika ANOVA. P-hodnota byla považována za statisticky signifikantní při hodnotě nižší než 0,05.

4. Výsledky

4.1. Hodnocení exprese DNA reparačních genů u pacientů s MDS

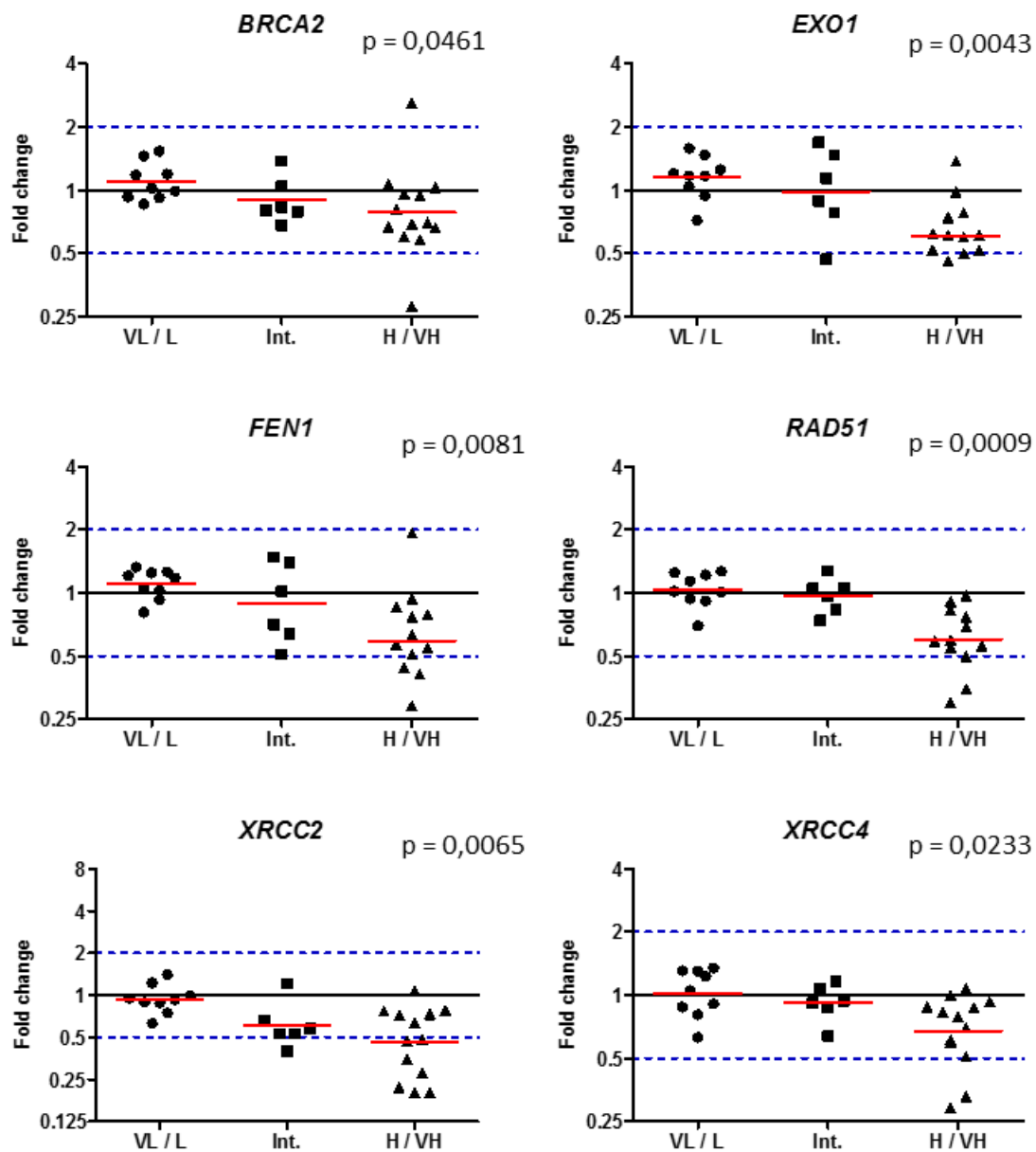
4.1.1. Některé DNA reparačních geny mají u pacientů s MDS deregulovanou genovou expresi

Expresní profilování DNA reparačních genů na vzorku 28 pacientů s diagnózou MDS, rozdělených do skupin podle prognostického skóre IPSS-R, odhalilo statisticky významně odlišnou genovou expresi u některých genů mechanismu DNA reparace. Porovnáním hladiny genové exprese mezi skupinami pacientů s MDS nízkého, středního a vysokého rizika podle IPSS-R kritérií jsme identifikovali tři abnormální expresní profily. První expresní profil se vyznačoval zvýšenou hladinou genové exprese u pacientů s MDS nízkého rizika, naopak u pacientů s vysoce rizikovým onemocněním, byla hladina genové exprese snížena. Tento abnormální expresní profil vykazovaly geny *BRCA2* ($p = 0,0461$), *EXO1* ($p = 0,0043$), *FEN1* ($p = 0,0081$), *RAD51* ($p = 0,0009$), *XRCC2* ($p = 0,0065$) a *XRCC4* ($p = 0,0233$). Grafické vyjádření genové exprese těchto genů u vyšetřovaných pacientů ukazuje obrázek 4.1.

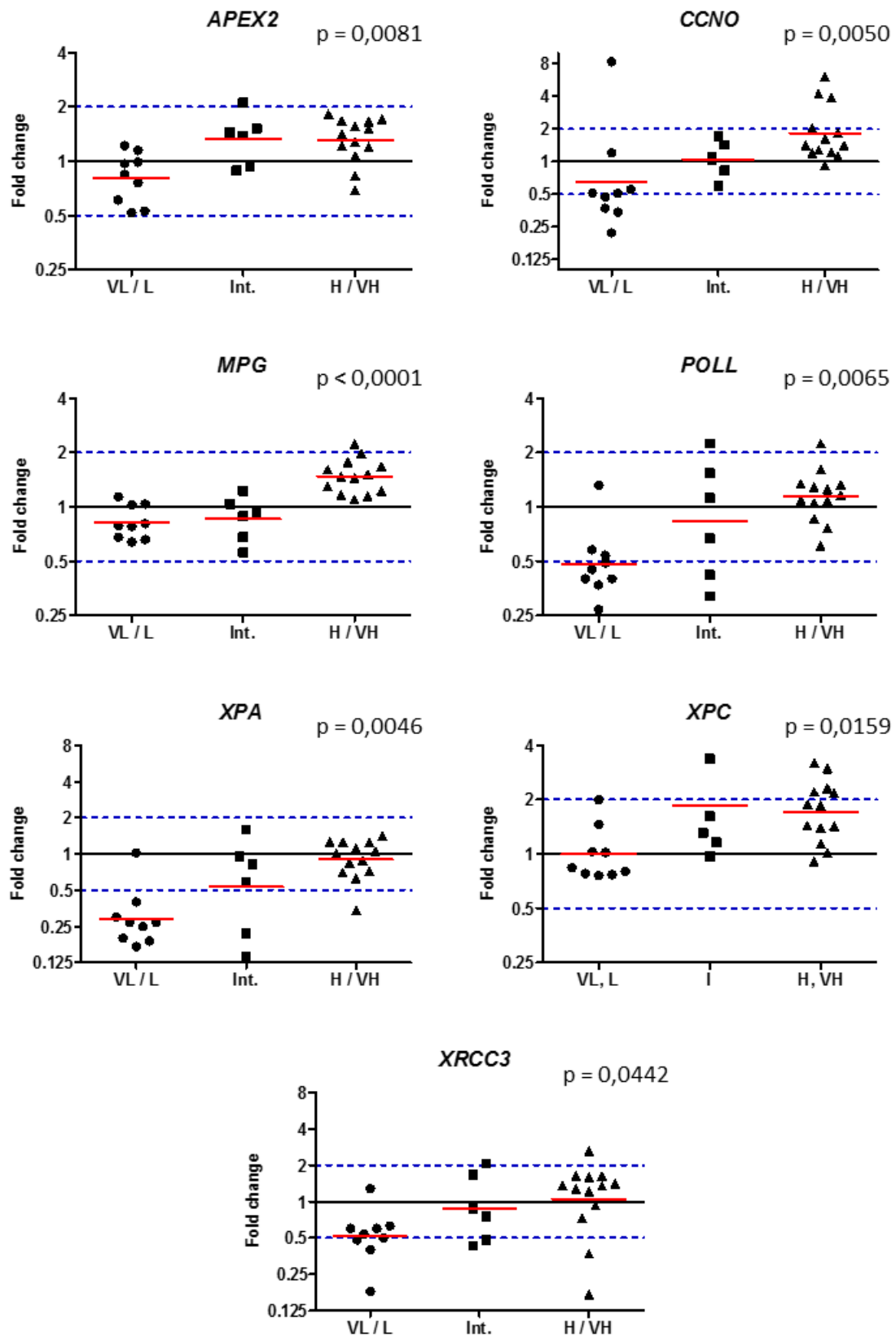
V případě druhého abnormálního expresního profilu byla hladina genové exprese snížena u pacientů s nízkým rizikem a progresivně se zvyšovala směrem k vysoce rizikovým případům MDS. Takovýto vzor genové exprese jsme našli u genů *APEX2* ($p = 0,0081$), *CCNO* ($p = 0,0050$), *MPG* ($p < 0,0001$), *POLL* ($p = 0,0065$), *XPA* ($p = 0,0046$), *XPC* ($p = 0,0159$) a *XRCC3* ($p = 0,0442$) (obrázek 4.2).

Hladina genové exprese u třetí skupiny genů byla snížena v celém souboru pacientů bez ohledu na rizikovou kategorii onemocnění. Do této poslední skupiny patřily geny *NEIL1* s 1,63násobným poklesem hladiny genové exprese ($p = 0,0493$), *RPA3* s 1,42násobným poklesem ($p = 0,0282$) a gen *XRCC6* s poklesem hladiny genové exprese o 1,19násobek ($p = 0,0270$) (obrázek 4.3). Uvedené hodnoty jsou spočítány jako geometrický průměr hladin genové exprese jednotlivých vyšetřovaných pacientů.

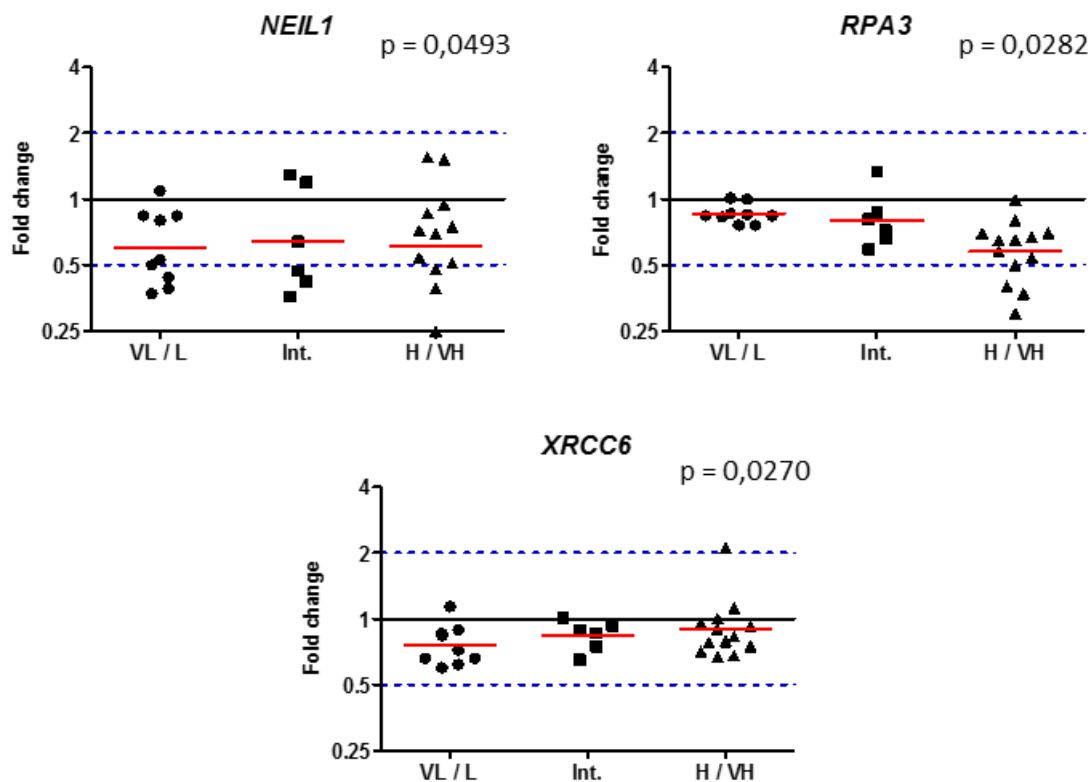
Obrázek 4.1 Abnormální vzorec genové exprese číslo 1. Zvýšená exprese u MDS s nízkým rizikem a snížená exprese u MDS vysokého rizika. (VL = very low; L = low; Int = Intermediate; H = high; VH = very high).



Obrázek 4.2 Abnormální vzorec genové exprese číslo 2. Snížená exprese u MDS s nízkým rizikem a zvýšená exprese u MDS vysokého rizika. (Zkratky stejné jako u obrázku 4.1).



Obrázek 4.3 Abnormální vzorec genové exprese číslo 3. Snížená exprese u všech pacientů s MDS bez ohledu na rizikovou kategorii. (Zkratky stejné jako u obrázku 4.1).

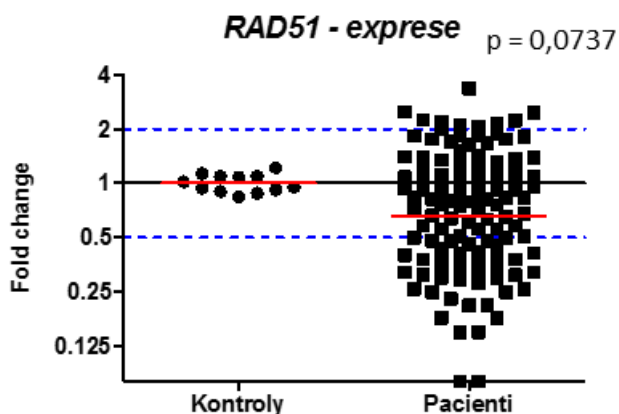


4.1.2. Hladina genové exprese genů *RAD51*, *XRCC2* a *RPA3* vykazuje klesající tendenci od časných k pozdním formám MDS

Pro podrobnější analýzu exprese genů DNA reparace byly z výše uvedených skupin vybrány reprezentativní geny, jejichž exprese byla hodnocena na validační kohortě pacientů s diagnózou MDS.

Geometrický průměr hladiny exprese genu *RAD51* v celé validační kohortě byl 1,51násobně nižší, než u kontrolní skupiny. Hodnota však nedosáhla statistické významnosti ($p = 0,0737$) (obrázek 4.4).

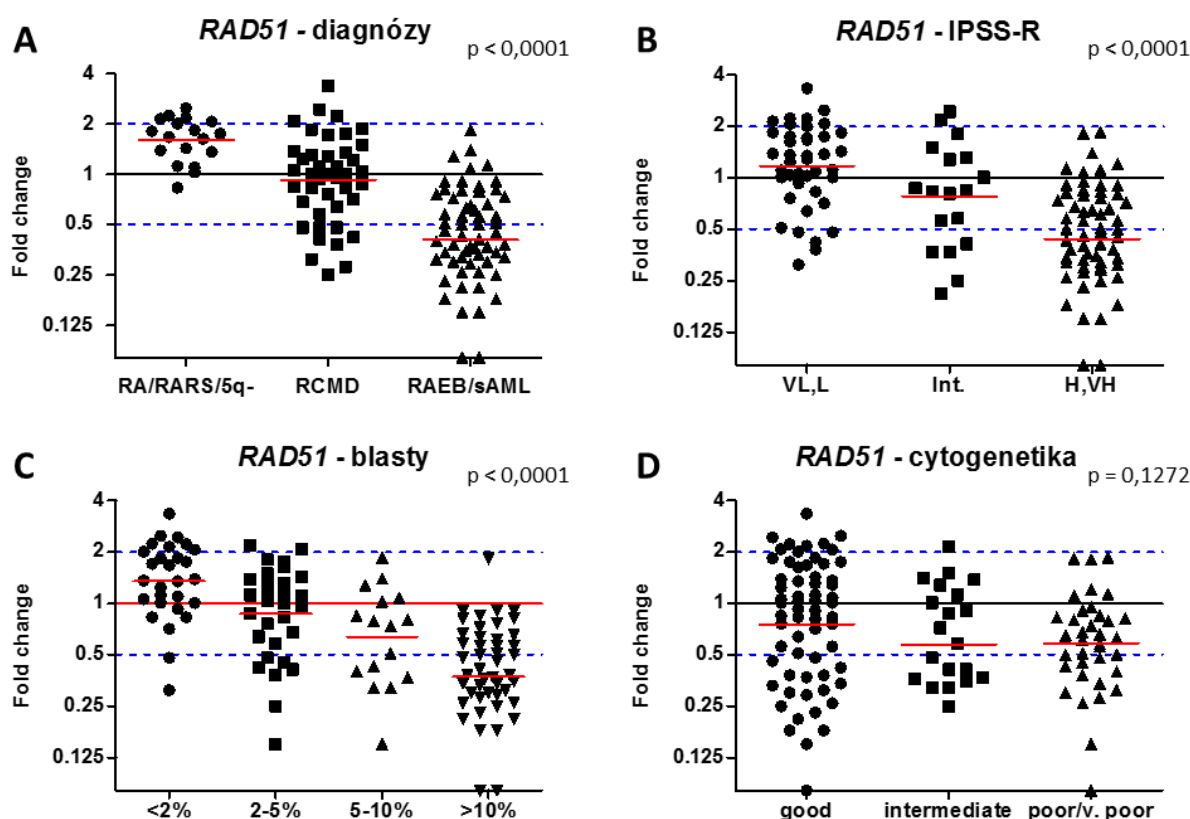
Obrázek 4.4 Exprese genu *RAD51* v celé validační kohortě pacientů s MDS.



Při rozdělení pacientů validační kohorty do skupin dle podtypů MDS na základě WHO klasifikace se potvrdila dříve pozorovaná abnormální genová exprese. Nejvyšší exprese genu byla nalezena u nemocných s nízké rizikovými formami onemocnění, tedy RA, RARS a 5q-syndrom (změna exprese – fold change (FC) = +1,60; $p = 0,0003$); naopak nejnižší genová exprese byla přítomna u pacientů s vysoce rizikovými podtypy MDS – RAEB-1, RAEB-2 a AML s MLD (FC = -2,45; $p < 0,0001$). Skupina pacientů s RCMD vykazovala hladinu genové exprese srovnatelnou s kontrolní skupinou (FC = -1,08; $p = 0,8514$). Statistické srovnání hladiny genové exprese u všech tří skupin pacientů bylo vysoce signifikantní ($p < 0,0001$) (obrázek 4.5A). Rozdělením pacientů podle prognostického systému IPSS-R bylo zjištěno statisticky významné zvýšení genové exprese u skupiny pacientů s příznivou prognózou, zahrnující prognostické kategorie very low a low (FC = +1,18; $p = 0,0725$), naopak nejnižší genová exprese byla přítomna ve skupině nemocných s nejhorší prognózou, kam byly zařazeny prognostické kategorie high a very high (FC = -2,31; $p < 0,0001$). Exprese genu u pacientů se středně závažnou prognózou, prognostická kategorie intermediate, se statisticky

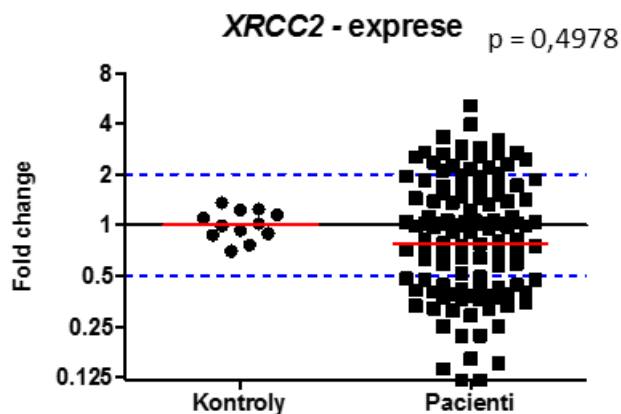
neližila od kontrolní populace ($FC = -1,28$; $p = 0,2443$). Srovnáním těchto tří prognostických skupin se opět ukázal statisticky významný trend poklesu genové exprese směrem k závažnějším formám MDS ($p < 0,0001$) (obrázek 4.5B). Rozdělením pacientů podle počtu myeloidních blastů hodnoceného morfologickým vyšetřením aspirátu kostní dřeně jsme zjistili statisticky významné zvýšení exprese genu v nemocných s méně než 2 % blastů ($FC = +1,35$; $p = 0,0205$) a statisticky významné snížení genové exprese u pacientů s více než 10 % blastů ($FC = -2,69$; $p < 0,0001$). Vzájemným srovnáním skupin pacientů dle rostoucího počtu myeloidních blastů v kostní dřeni jsme opět získali vysoce signifikantní výsledek s jasným trendem postupného poklesu exprese genu směrem k pokročilemu MDS ($p < 0,0001$) (obrázek 4.5C). Posledním užitým distribučním kritériem byl cytogenetický nálezi, kdy byli pacienti rozděleni do skupin s velmi příznivým / příznivým, intermediárním a nepříznivým / velmi nepříznivým cytogenetickým nálezem podle kritérií IPSS-R. Identifikováno bylo statisticky významné snížení exprese genu u nemocných s nepříznivým cytogenetickým nálezem ($FC = -1,71$; $p = 0,0010$). Vzájemné srovnání všech tří skupin nebylo statisticky významné ($p = 0,1272$), zůstal ale zachován trend poklesu genové exprese směrem ke skupině s nejméně prognosticky příznivou hodnotou sledovaného kritéria (obrázek 4.5D).

Obrázek 4.5 Pokles hladiny exprese genu *RAD51* při rozdělení pacientů podle podtypu MDS (A), prognostického skóre IPSS-R (B), procenta blastů v KD (C) a cytogenetiky (D).



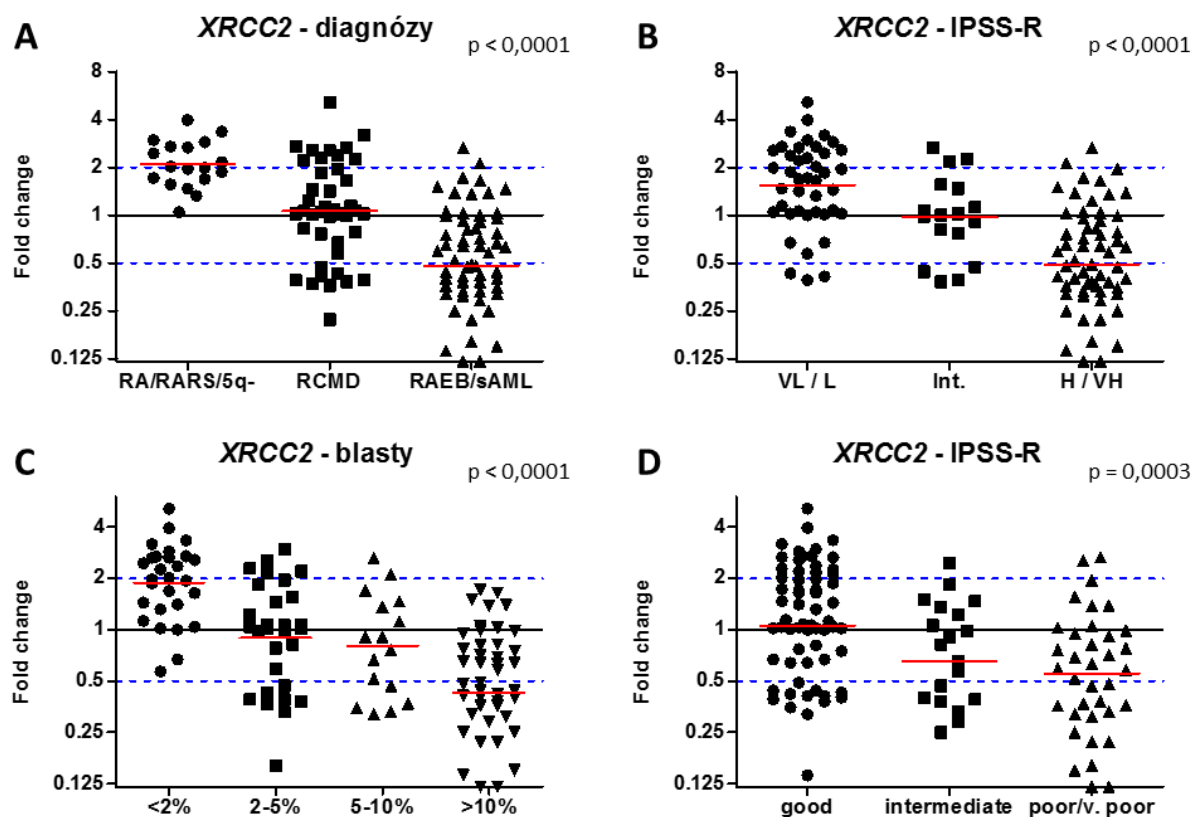
U genu *XRCC2* byl geometrický průměr hladiny genové exprese ve validační kohortě pacientů 1,28násobně nižší oproti kontrolní skupině, hodnota nebyla statisticky signifikantní ($p = 0,4978$) (obrázek 4.6).

Obrázek 4.6 Exprese genu *XRCC2* v celé validační kohortě pacientů s MDS.



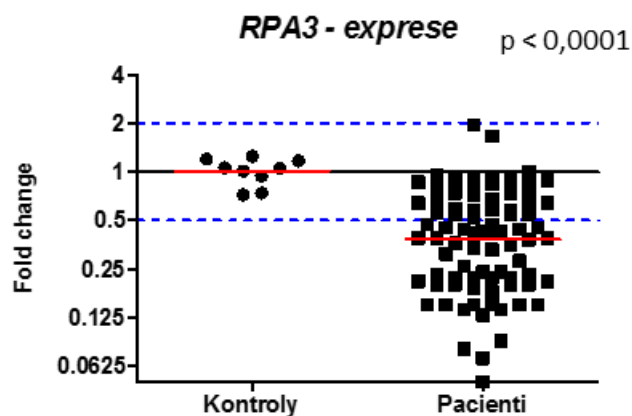
Po rozdělení pacientů do skupin dle podtypů MDS podle WHO klasifikace byly již získány statisticky signifikantní výsledky. Ve skupině pacientů s MDS RA, RARS a 5q-syndromem byla hladina genové exprese statisticky významně zvýšena proti kontrolní skupině ($FC = +2,09$; $p < 0,0001$). U skupiny nemocných s MDS RAEB-1, RAEB-2 a sekundární akutní myeloidní leukemií byla hladina genové exprese signifikantně snížena ($FC = -2,08$; $p = 0,0020$). Exprese sledovaného genu u nemocných s MDS RCMD nebyla odlišná od exprese genu v kontrolní skupině ($FC = +1,06$; $p = 0,6322$). Vzájemným srovnáním všech tří skupin pacientů se podobně jako u genu *RAD51* ukázal statisticky významný trend poklesu genové exprese od časných forem MDS k pokročilým formám onemocnění ($p < 0,0001$) (obrázek 4.7A). Rozdělením pacientů do skupin podle prognostického systému IPSS-R (stejných jako u genu *RAD51*) bylo prokázáno zvýšení exprese ve skupině pacientů s nízkým rizikem ($FC = +1,55$; $p = 0,0062$) a snížení exprese u nemocných ve skupině prognosticky nepříznivé ($FC = -2,04$; $p = 0,0021$). Nemocní se středním rizikem měli expresi genu na úrovni kontrolní skupiny ($FC = -1,03$; $p = 0,9647$). Srovnání všech tří skupin ukázalo opět statisticky významný trend poklesu genové exprese spolu se zhoršující se prognózou nemocných ($p < 0,0001$) (obrázek 4.7B). Podobný trend poklesu genové exprese, s menší statistickou významností, byl svázán také se vzrůstajícím procentem myeloidních blastů v kostní dřeni pacientů ($p < 0,0001$) (obrázek 4.7C) a rostoucí rizikovostí cytogenetického nálezu ($p = 0,0003$) (obrázek 4.7D).

Obrázek 4.6 Pokles hladiny exprese genu *XRCC2* při rozdělení pacientů podle podtypu MDS (A), prognostického skóre IPSS-R (B), procenta blastů v KD (C) a cytogenetiky (D).



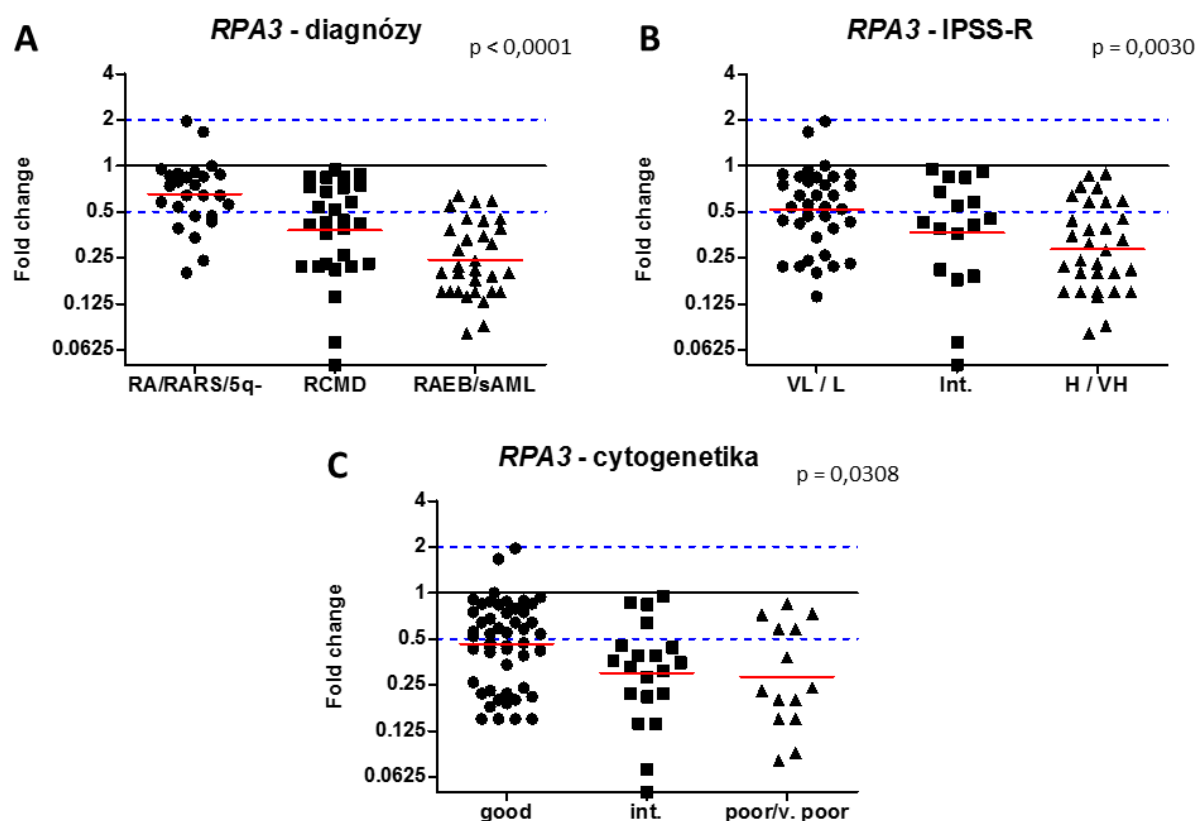
Na rozdíl od výše popisovaných genů byla exprese genu *RPA3* snížena v naprosté většině vzorků z validační kohorty MDS pacientů (pouze u dvou vzorků byla exprese zvýšena) s průměrnou hladinou exprese 2,65násobně nižší, než u kontrolní skupiny ($p < 0,0001$) (obrázek 4.8).

Obrázek 4.8 Exprese genu *RPA3* v celé validační kohortě pacientů s MDS.



Relativně nejméně byla exprese snížena u pacientů s časnými formami MDS (FC = -1,52; $p = 0,0046$), následována expresí u nemocných se středně pokročilým onemocněním charakterizovaným diagnózou RCMD (FC = -2,64; $p < 0,0001$) a nejdramatičtějším snížením exprese u nemocných s pokročilým onemocněním (FC = -4,14; $p < 0,0001$). Při vzájemném srovnání jednotlivých skupin pacientů byl opět prokázán statisticky významný trend poklesu genové exprese a to nejen při rozdělení nemocných dle diagnózy / pokročilosti onemocnění ($p < 0,0001$), ale také při distribuci nemocných dle prognostického systému IPSS-R ($p = 0,0030$) a cytogenetiky ($p = 0,0308$) (obrázek 4.9).

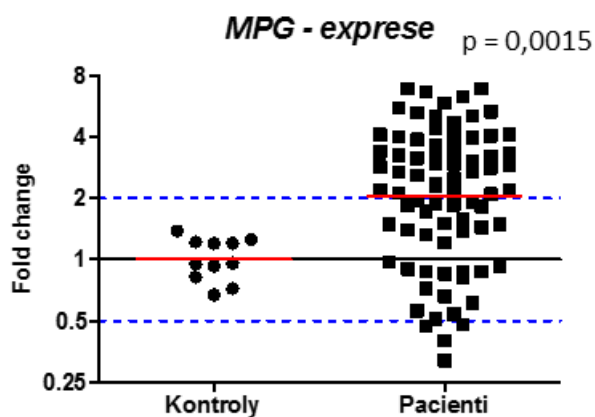
Obrázek 4.9 Pokles hladiny exprese genu *RPA3* při rozdělení pacientů podle podtypu MDS (A), prognostického skóre IPSS-R (B) a cytogenetiky (C).



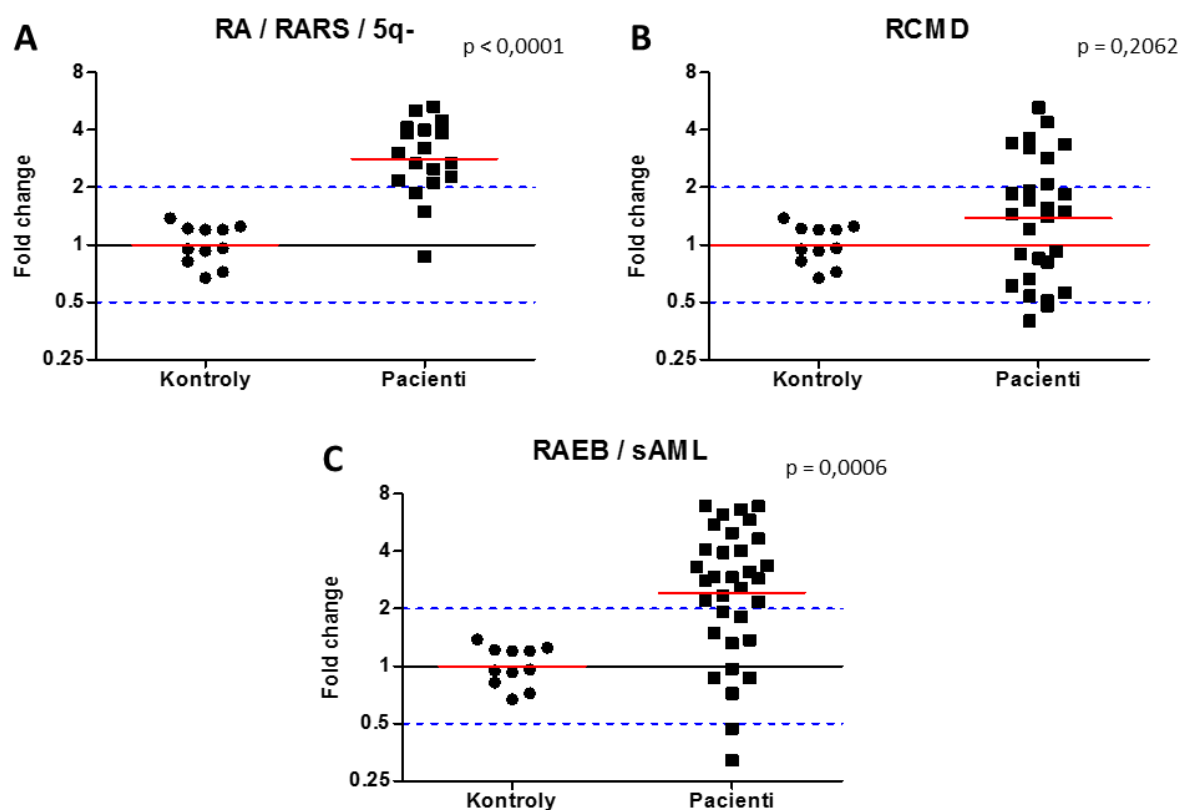
V případě genu *MPG* byla prokázána statisticky významně zvýšená průměrná hladina exprese ve srovnání s kontrolní skupinou (FC = +2,06; $p = 0,0015$). Toto zvýšení genové exprese bylo patrné u všech podtypů MDS (obrázek 4.10). U časných forem onemocnění bylo zvýšení nejmarkantnější (FC = +2,83; $p < 0,0001$), u nemocných s RCMD byla exprese taktéž zvýšena, v tomto případě ale nikoli signifikantně (FC = +1,38; $p = 0,2062$) a pacienti s pokročilými formami MDS měli opět expresi genu významně zvýšenou (FC = +2,43; $p =$

0,0006) (obrázek 4.11). Nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly ve zvýšení exprese genu při vzájemném srovnání nemocných rozdělených skupin podle subtypů MDS, prognostických kategorií dle IPSS-R a cytogenetiky.

Obrázek 4.10 Exprese genu *MPG* v celé validační kohortě pacientů s MDS.

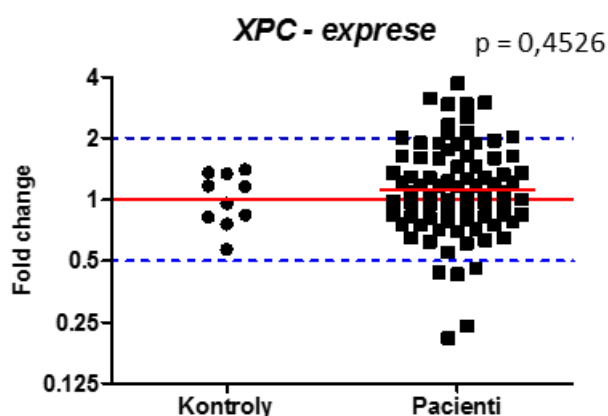


Obrázek 4.11 Exprese genu *MPG* ve srovnání s kontrolami ve skupině pacientů s nízkými rizikovými formami MDS (A), ve skupině nemocných s RCMD (B) a ve skupině pacientů s MDS pokročilým MDS (C).

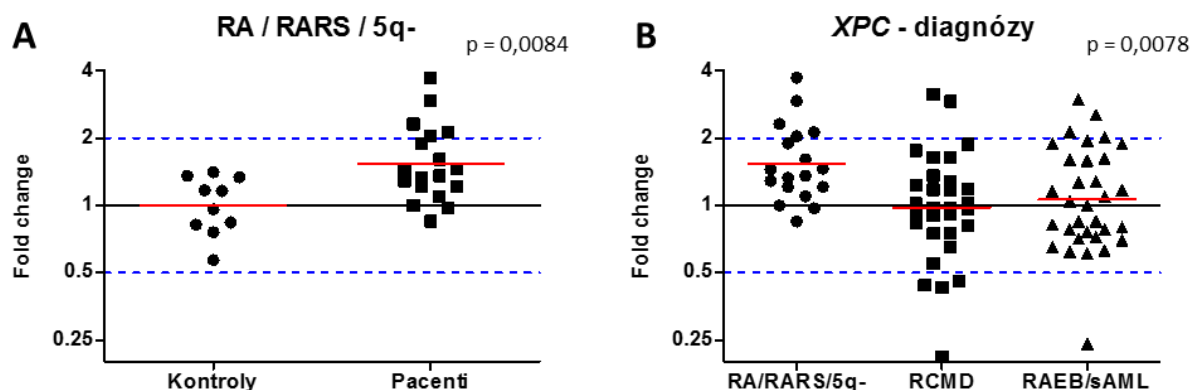


Posledním genem, jehož exprese byla u pacientů s MDS ve validační kohortě podrobněji studována, byl gen *XPC*. Průměrná hladina exprese tohoto genu se statisticky významně neodlišovala od hladiny exprese v kontrolní skupině (FC = +1,12; $p = 0,4526$) (obrázek 4.12). Signifikantní zvýšení exprese tohoto genu proti kontrolní skupině bylo prokázáno pouze u nemocných s nízké rizikovými formami MDS, tedy RA, RARS a 5q-syndromem (FC = +1,55; $p = 0,0084$) a toto zvýšení exprese bylo statisticky významné také při vzájemném srovnání se skupinami pacientů s RCMD a skupinou s pokročilými formami MDS ($p = 0,0078$) (obrázek 4.13). Exprese genu mezi jednotlivými skupinami se signifikantně nelišila při rozdělení pacientů podle prognostického systému IPSS-R ani při rozdělení podle cytogenetických kategorií.

Obrázek 4.12 Exprese genu *XPC* v celé validační kohortě pacientů s MDS.



Obrázek 4.13 Exprese genu *XPC* ve srovnání s kontrolní skupinou u nemocných s nízké rizikovými formami MDS (A) a srovnání s ostatními skupinami pacientů rozdělených dle podtypů MDS (B).

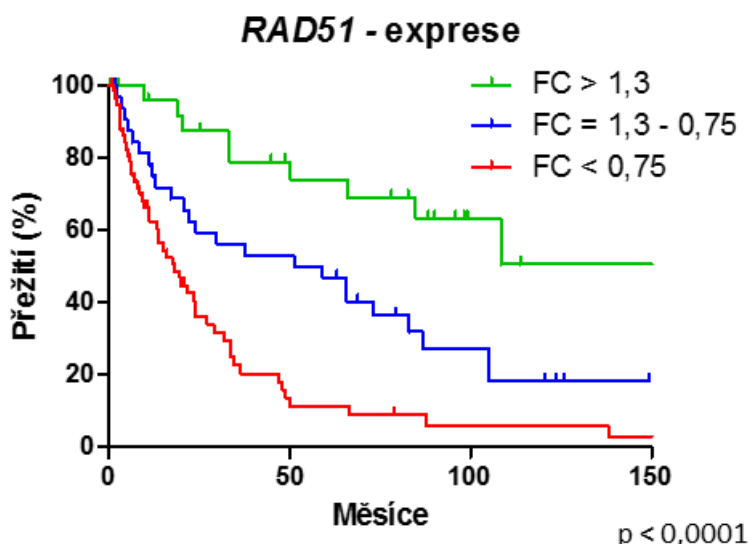


4.1.3 Na podkladě rozdílných hladin exprese genů *RAD51*, *XRCC2* a *RPA3* lze nemocné rozdělit do skupin s odlišným celkovým přežitím

Na základě poznatku o abnormální expresi výše studovaných DNA reparačních genů jsme se v další fázi našeho výzkumu snažili najít souvislost mezi hladinou exprese těchto genů a celkovým přežitím pacientů s diagnózou MDS. Využili jsme hodnoty exprese genů u nemocných, kteří tvořili naši validační kohortu a pro konstrukci Kaplan-Meierových křivek jsme pacienty rozdělili do skupin s vysokou, normální a nízkou expresí genu. K rozlišení těchto skupin jsme empiricky stanovili hladinu exprese 1,3násobně vyšší a 1,3násobně nižší proti kontrolním vzorkům.

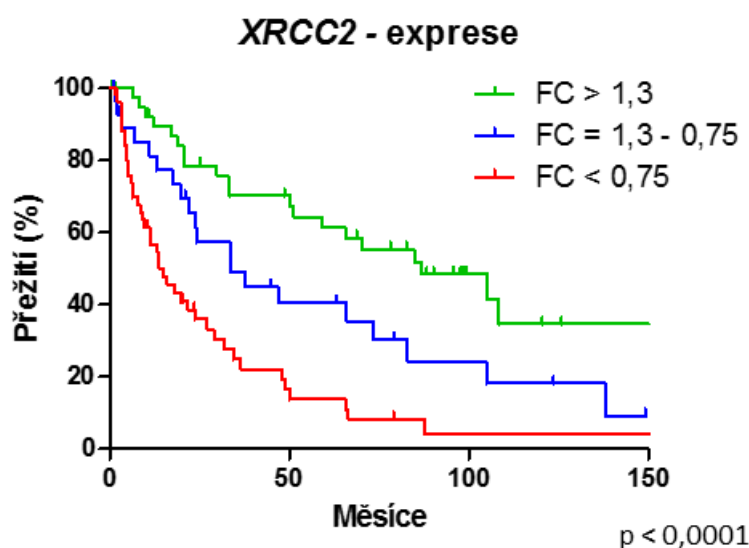
Na základě odlišné exprese genu *RAD51* byly jasně definovány tři skupiny pacientů s odlišnou délkou celkového přežití, nemocní s vysokou expresí genu měli nejdelší celkové přežití, nemocní s nízkou expresí genu přežívali nejhůře a skupina pacientů s normální expresí genu měla středně dobrou délku celkového přežití. Statistická významnost rozdělení křivek dle Mantel-Coxova testu byla menší než 0,0001 (obrázek 4.14). Pomocí hladiny exprese genu *RAD51* jsme se pokusili odlišit nemocné s různou délkou celkového přežití také v podskupině pacientů s diagnózou RCMD, výsledek ale nebyl statisticky významný.

Obrázek 4.14 Křivka celkového přežití pacientů rozdělených do skupin s vysokou, střední a nízkou expresí genu *RAD51*.



Při použití expresní hladiny genu *XRCC2*, jako kritéria určujícího celkové přežití nemocných, byly opět definovány tři skupiny pacientů se signifikantně odlišnou délkou přežití. Pacienti s vysokou expresí genu přežívali nejdéle, pacienti s nízkou expresí měli celkové přežití nejkratší ($p < 0,0001$) (obrázek 4.15).

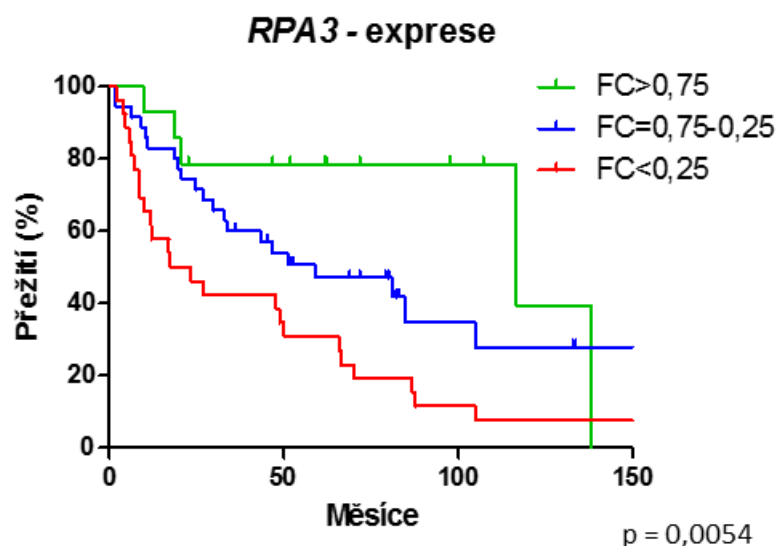
Obrázek 4.15 Křivka celkového přežití pacientů rozdělených do skupin s vysokou, střední a nízkou expresí genu *XRCC2*.



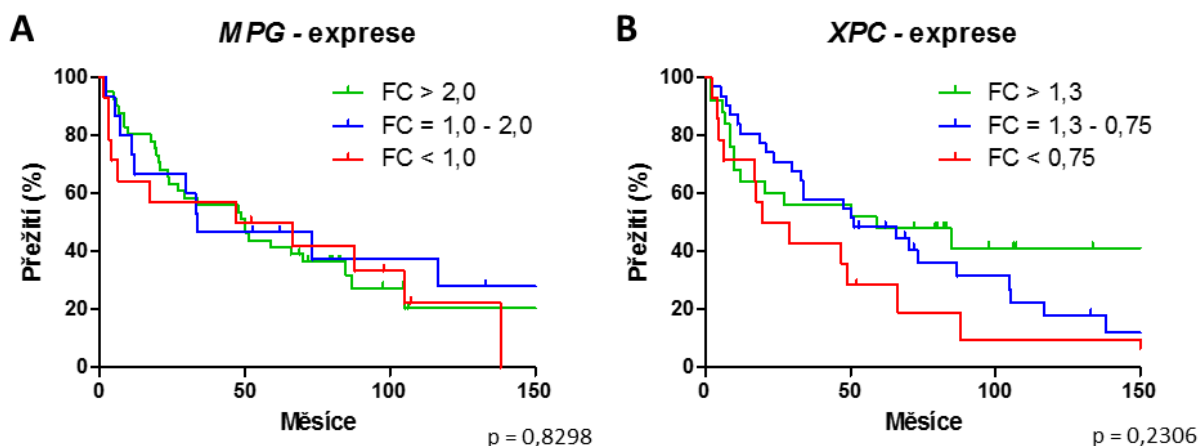
Vzhledem k celkově snížené hladině exprese genu *RPA3* ve zkoumaném vzorku byly pro tento gen použity nižší hodnoty exprese ($FC = 0,75$ a $FC = 0,25$) k oddělení pacientů s vyšší, střední a nízkou expresí genu. Opět došlo ke statisticky významné selekci nemocných dle délky celkového přežití ($p = 0,0054$), pacienti s nejméně sníženou expresí genu přežívali nejdéle a u jedinců s nejvyšším poklesem exprese bylo celkové přežití nejvíce zkráceno (obrázek 4.16).

Nebyla prokázána závislost celkového přežití nemocných s MDS na expresi genu *MPG* ($p = 0,8298$) ani na expresi genu *XPC* ($p = 0,2306$) (obrázek 4.17). U genu *MPG* byly z důvodu celkově zvýšené exprese použity vyšší hodnoty exprese ($FC = 2,00$ a $FC = 1,00$) k oddělení pacientů s vyšší, střední a nízkou expresí genu.

Obrázek 4.16 Křivka celkového přežití pacientů rozdělených do skupin s vysokou, střední a nízkou expresí genu *RPA3*.



Obrázek 4.17 Křivka celkového přežití pacientů rozdělených do skupin s vysokou, střední a nízkou expresí genu *MPG* (A) a genu *XPC* (B).



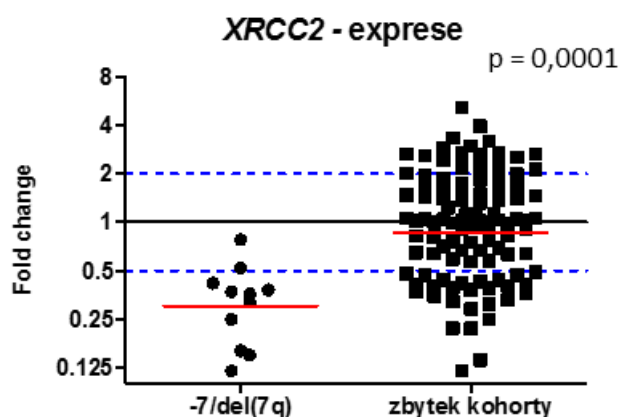
4.1.4. Abnormality 7. chromozomu jsou spojeny s nejnižší hladinou exprese genů *XRCC2* a *RAD51*

Ztráta chromozomu 7 a přítomnost dvou chromozomálních abnormalit, z nichž jednou je delece dlouhého ramene chromozomu 7, jsou řazeny mezi nepříznivé (poor) cytogenetické nálezy u nemocných s MDS podle prognostického systému IPSS-R, samotná delece dlouhého ramene 7. chromozomu je potom řazena do středně rizikové (intermediate) cytogenetické skupiny. Naproti tomu nález izolované delece dlouhého ramene chromozomu 20 je hodnocen

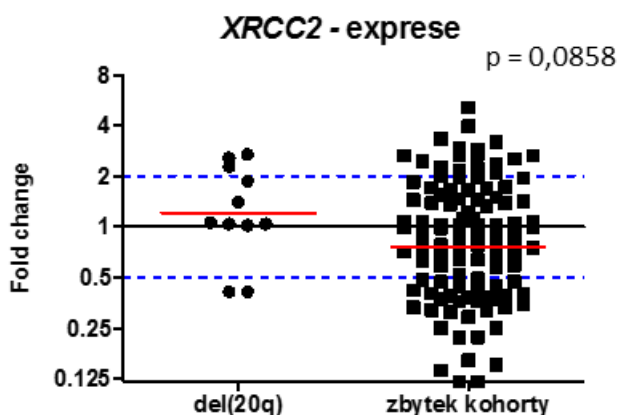
jako prognosticky příznivý (good). Popisované prognostické rozdělení cytogenetických změn obrazuje tabulka 1.7 (Schanz et al., 2012). V naší kohortě nemocných s MDS jsme shromáždili vzorky 11 pacientů s abnormalitami 7. chromozomu a 9 pacientů s delecí dlouhého ramene 20. chromozomu. U těchto vzorků jsme změřili hladinu exprese genů *XRCC2* a *RAD51* a získané výsledky jsme porovnali s hladinami exprese těchto genů u zbytku pacientů, u kterých byl prokázán jak normální karyotyp, tak různé cytogenetické léze včetně komplexních přestaveb karyotypu.

Pacienti se změnami chromozomu 7, tedy monosomií 7 a delecí 7q, vykazovali signifikantně nižší expresi genu *XRCC2* ve srovnání se zbytkem kohorty ($p = 0,0001$) (obrázek 4.18). Hladina exprese genu *XRCC2* u nemocných s delecí dlouhého ramene 20. chromozomu byla vyšší, než u nemocných, kteří tuto abnormalitu neměli ($p = 0,0858$) (obrázek 4.19).

Obrázek 4.18 Signifikantně nižší hladina exprese genu *XRCC2* u pacientů s abnormalitami 7. chromozomu oproti zbytku kohorty pacientů.

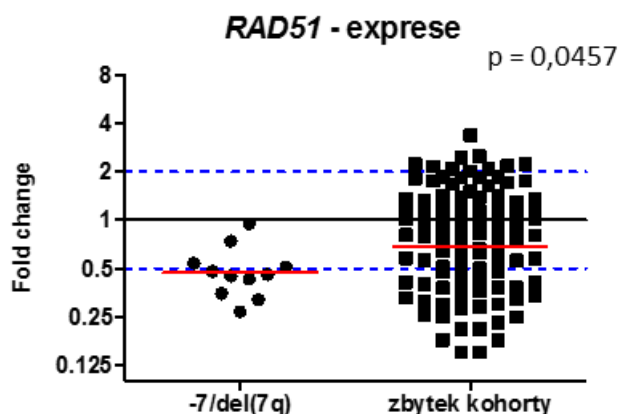


Obrázek 4.19 Zvýšená exprese genu *XRCC2* u pacientů s del(20q) oproti pacientům bez této delecce.

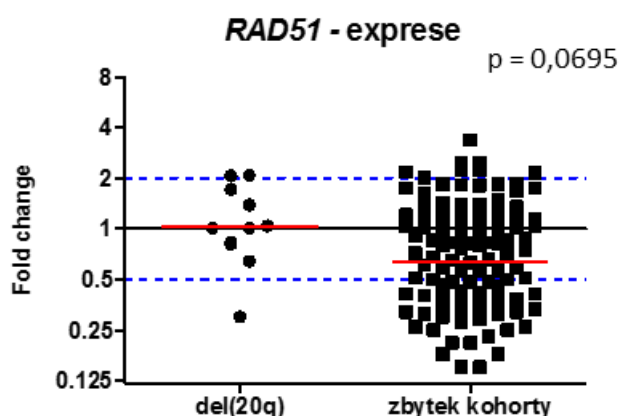


Měření hladiny exprese genu *RAD51* přineslo podobné výsledky. U nemocných s abnormalitami 7. chromozomu byla exprese signifikantně nižší ve srovnání s ostatními pacienty ($p = 0,0457$) (obrázek 4.20) a přítomnost delece dlouhého ramene chromozomu 20 byla spojena se zvýšenou expresí genu *RAD51* ($p = 0,0695$) (obrázek 4.21). Nedosažení statistické významnosti u delece 20q lze v obou případech přičíst nízkému počtu zkoumaných vzorků.

Obrázek 4.20 Signifikantně nižší hladina exprese genu *RAD51* u pacientů s abnormalitami 7. chromozomu oproti zbytku kohorty pacientů.



Obrázek 4.21 Zvýšená exprese genu *RAD51* u pacientů s del(20q) oproti pacientům bez této cytogenetické abnormality.



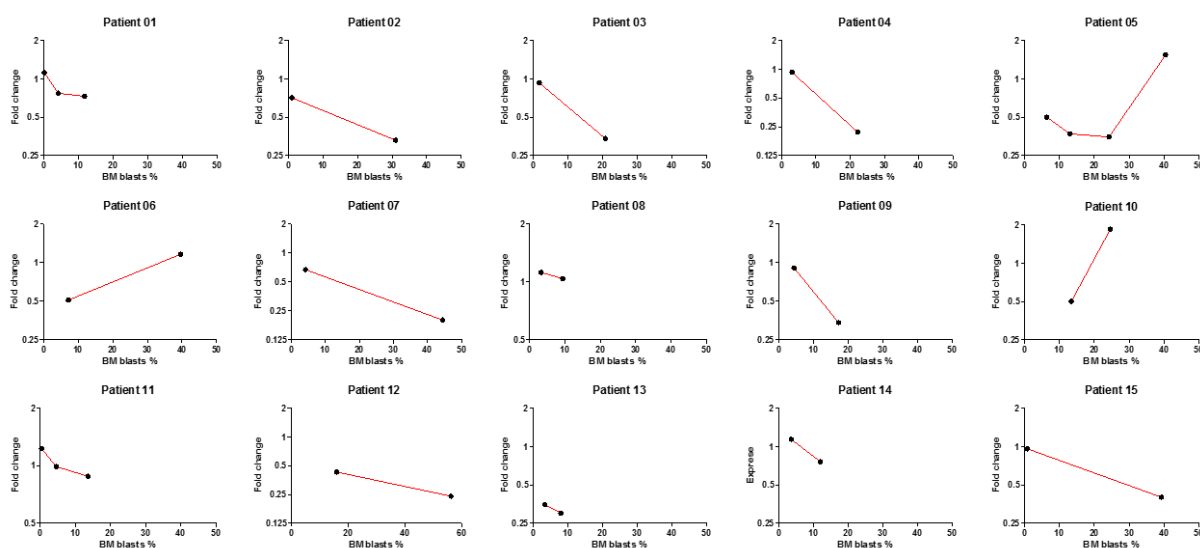
4.1.5. Při progresi MDS dochází u konkrétního pacienta k postupnému snížení exprese genů *RAD51* a *XRCC2*

V další fázi studie bylo provedeno měření hladiny exprese genů *RAD51* a *XRCC2* u sériových vzorků pacientů s progredujícím MDS, hodnoceny byly 2 až 4 vzorky od jednoho pacienta. Jako progresi onemocnění byl chápán vrůstající počet myeloidních blastů v kostní dřeni. Celkem se podařilo shromáždit materiál 15 nemocných s prokázanou progresí choroby.

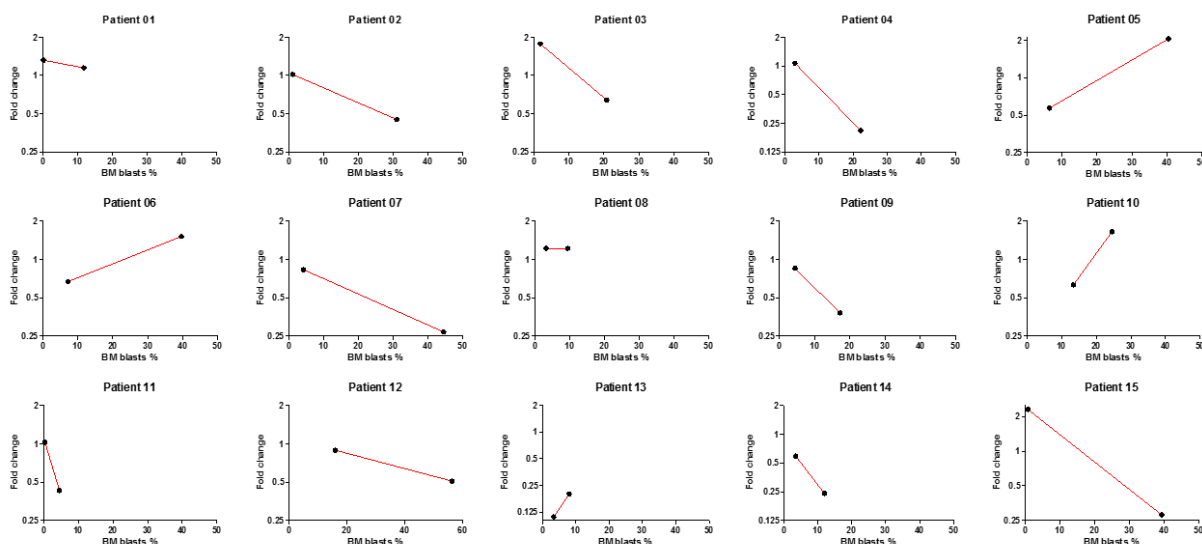
Hodnocení genu *RAD51* prokázalo postupný pokles hladiny exprese tohoto genu spolu s progresí MDS u 13 z 15 sledovaných pacientů. Současně byly zdokumentovány 3 případy, kdy došlo po překročení hodnoty 30 % blastů v kostní dřeni k opětovnému vzrůstu exprese tohoto reparačního genu (obrázek 4.22). Postupný pokles hladiny genové exprese genu *XRCC2* v průběhu progresi onemocnění byl pozorován v 10 z 15 případech. Opětovné zvýšení exprese po dosažení limitu 30 % blastů bylo přítomno u stejných 3 nemocných jako v případě předchozího genu (obrázek 4.23).

Obrázek 4.22 Křivky znázorňující na ose Y expresi genu *RAD51* u konkrétních pacientů v průběhu progresi onemocnění vyjádřené na ose X jako zvyšující se procento blastů v KD. Povšimněte si křivky u pacienta číslo 5, po překročení hranice cca 30 % blastů v KD dochází k opětovnému vzrůstu exprese genu (podobně vzrůst exprese u pacientů č. 6 a č. 10).

Obrázek ve velikosti A4 viz příloha číslo 1 na straně 84.



Obrázek 4.23 Křivky znázorňující na ose Y expresi genu *XRCC2* u konkrétních pacientů v průběhu progresu onemocnění vyjádřené na ose X jako zvyšující se procento blastů v KD. U pacientů č. 5, č. 6 a č. 10 vzestup exprese po dosažení hranice cca 30 % blastů. Obrázek ve velikosti A4 viz příloha číslo 2 na staně 85.



4.1.6. Hladina exprese genu *RAD51* v čase diagnózy je významným nezávislým prognostickým faktorem pro celkové přežití pacientů s MDS

K určení nezávislého vlivu jednotlivých klinických faktorů na celkové přežití pacientů s MDS byla provedena multivariantní analýza využívající Coxova regresního modelu. Posuzované proměnné zahrnovaly věk, pohlaví, procento myeloidních blastů v kostní dřeni, koncentraci hemoglobinu, počet zralých neutrofilních granulocytů, počet trombocytů, cytogenetický nálezn a hladinu exprese genu *RAD51*. Hodnoty těchto proměnných byly zjištěny v době diagnózy onemocnění.

Multivariantní analýza identifikovala hladinu exprese genu *RAD51* ($p = 0,0022$; HR 0.43; 95% CI pro HR 0,25–0,73), cytogenetickou kategorii podle IPSS-R ($p = 0,0002$; HR 1,72; 95% CI pro HR 1,30–2,29) a počet myeloidních blastů v kostní dřeni ($p = 0,0323$; HR 1,04; 95% CI pro HR 1,00–1,07), zjištěné při diagnóze onemocnění, jako nezávislé prognostické faktory pro délku celkového přežití nemocných. Hodnota hazard ratio (HR) < 1 u hladiny exprese genu *RAD51* přitom vyjadřuje výše popsáný nepřímý úměrný vztah vyššího rizika úmrtí, a tedy zkráceného přežití, při nižší hladině exprese genu. Výsledky multivariantní analýzy shrnuje tabulka 4.1.

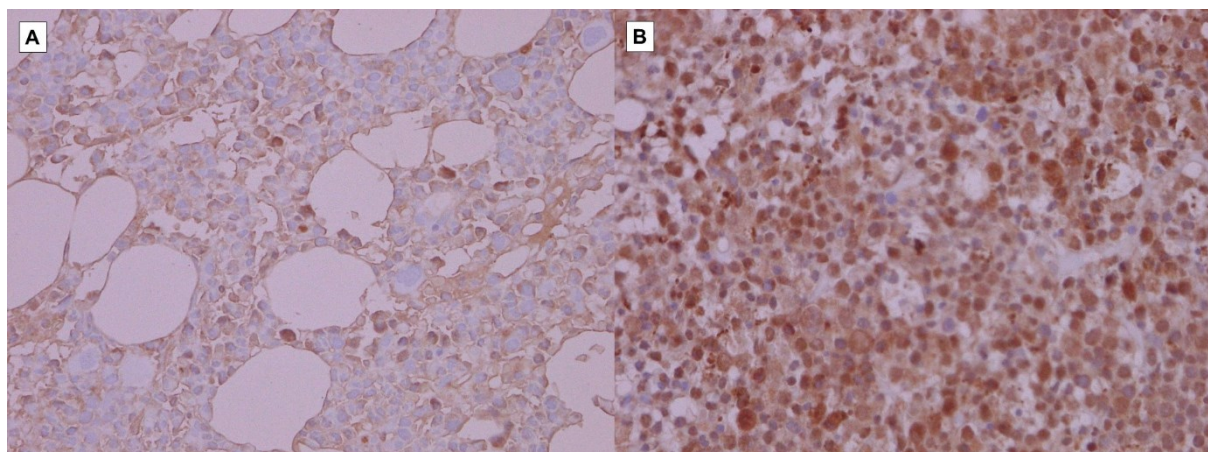
Tabulka 4.1. Výsledky multivariantní analýzy identifikující hladinu exprese genu *RAD51* v čase diagnózy, karyotyp a procento blastů v kostní dřeni jako nezávislé signifikantní prognostické faktory pro celkové přežití pacientů s MDS.

	p-hodnota	Hazard ratio	95% CI
Věk	0,9353	1,0009	0,9794–1,0229
Pohlaví	0,2041	1,4229	0,8278–2,4458
% blastů v KD	0,0323	1,0360	1,0032–1,0699
Hemoglobin	0,5002	0,9955	0,9825–1,0086
Karyotyp	0,0002	1,7248	1,2991–2,2900
Počet neutrofilů	0,1261	1,0226	0,9939–1,0521
Počet trombocytů	0,0804	0,9981	0,9959–1,0002
exprese <i>RAD51</i>	0,0022	0,4262	0,2474–0,7344

4.1.7. Imunohistochemická aktivita proteinu *RAD51* je odlišná u pacientů s MDS nízkého a vysokého rizika

Imunohistochemické barvení trepanobiopsických vzorků pacientů s MDS nízkého rizika a pacientů s MDS s vysokým rizikem odhalilo rozdíly v intracelulární lokalizaci proteinu *RAD51* mezi těmito dvěma skupinami nemocných. Ve vzorcích nemocných s MDS nízkého rizika byla přítomnost proteinu prokázána v cytoplazmě (1+ až 2+), ale jádra buněk byla ve všech vzorcích hodnocena jako *RAD51*-negativní (obrázek 4.24A). Naproti tomu vzorky nemocných s MDS vysokého rizika se vyznačovaly přítomností proteinu *RAD51* jak v cytoplazmě (1+ až 2+), tak v buněčném jádře (většinou 2+ až 3+) (obrázek 4.24B).

Obrázek 4.24 Imunohistochemické barvení proteinu *RAD51*. Vzorek MDS nízkého rizika vykazuje pozitivitu pouze v cytoplazmě (A), vzorek MDS vysokého rizika s pozitivitou v cytoplazmě i jádře (B).



4.2. Sekvenační analýza genů DNA reparace u pacientů s MDS

4.2.1. Detekce genetických variant cíleným sekvenováním a výběr variant potenciálně asociovaných se vznikem MDS

Ve vzorcích 16 pacientů s MDS vysokého rizika bylo v exonových částech zkoumaných DNA reparačních genů zjištěno celkem 232 genetických variant s dostatečnou technikou kvalitou a pokrytím více než 300 čteními. Pro další analýzu byly vybrány pouze missense a nonsense varianty, kterých bylo celkově 118, tedy 51 % ze všech zjištěných variant. U těchto variant byla vypočítána průměrná alelická frekvence pro majoritní a minoritní alelu v celém souboru pacientů. Vypočítaná hodnota frekvence minoritní alely (MAF) v naší studijní populaci a frekvence této minoritní alely v kontrolní populaci HapMAP-CEU sloužily pak k výpočtu hodnoty odds ratio pro každou vybranou genetickou variantu. Hodnoty MAF v kontrolní, zdravé, populaci HapMAP-CEU byly získány z volně internetové databáze NCBI-dbSNP (Sherry S.T. et al., 2001).

U šesti jednonukleotidových polymorfismů (SNP) s missense významem byla zjištěna statisticky signifikantní hodnota odds ratio značící, že tyto polymorfismy se statisticky častěji vyskytovaly v populaci pacientů s MDS, než v kontrolní zdravé populaci. Jednalo se o polymorfismy popsané v pěti různých DNA reparačních genech: rs4135113 (gen *TDG*, OR 4,41; $p = 0,0287$), rs12917 (*MGMT*, OR 3,33; $p = 0,0032$), rs2230641 (*CCNH*, OR 2,35; $p = 0,0118$), rs2228529 a rs2228526 (*ERCC6*, OR 2,06; $p = 0,0378$ respektive OR 2,15; $p = 0,0261$) a rs1799977 (*MLH1*, OR 1,86; $p = 0,0449$). Výsledky shrnuje tabulka 4.2.

Tabulka 4.2 Missense SNP identifikované metodou cíleného sekvenování v exonech DNA reparačních genů jako signifikantně asociované s rizikem vzniku MDS. Pro výpočet odds ratio byla jako kontrolní skupina zvolena populace HapMAP-CEU. (MAF – frekvence minoritní alely, 95% CI – interval spolehlivosti pro odds ratio, p-hodnota vypočtených odds ratio).

Gen	SNP	Genotyp	MAF pacienti	MAF HapMAP	Odds ratio	95% CI	p-hodnota
<i>MLH1</i>	rs1799977	A/G	0,50	0,35	1,857	1,052–3,278	0,0449
<i>CCNH</i>	rs2230641	A/G	0,37	0,20	2,349	1,243–4,440	0,0118
<i>ERCC6</i>	rs2228529	T/C	0,34	0,20	2,061	1,085–3,914	0,0378
<i>ERCC6</i>	rs2228526	T/C	0,35	0,20	2,154	1,136–4,083	0,0261
<i>MGMT</i>	rs12917	C/T	0,27	0,10	3,329	1,513–7,325	0,0032
<i>TDG</i>	rs4135113	G/A	0,12	0,03	4,409	1,204–16,150	0,0287

Po rozdělení testovaných pacientů do skupin dle rizikovosti cytogenetického nálezu (podle kritérií prognostického systému IPSS-R) jsme zjistili výrazné zesílení korelace mezi těmito polymorfismy a přítomností MDS u nemocných s vysoce rizikovým cytogenetickým nálezem (skupina nemocných s nepříznivou a velmi nepříznivou cytogenetikou dle IPSS-R). Hodnoty OR pro výše zmíněné polymorfismy se v této skupině nemocných pohybovaly od 4,16 do 9,66; p-hodnota pro každý z polymorfismů dosahovala hodnoty menší než 0,0001. Výsledky shrnuty v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3 Ve skupině pacientů s nepříznivou a velmi nepříznivou cytogenetikou podle IPSS-R došlo k signifikantnímu zesílení sledované závislosti mezi zkoumanými polymorfismy a rizikem vzniku MDS. Pro výpočet odds ratio byla jako kontrolní skupina zvolena populace HapMAP-CEU. (MAF – frekvence minoritní alely, 95% CI – interval spolehlivosti pro odds ratio, p-hodnota vypočtených odds ratio).

Gen	SNP	Genotyp	MAF pacienti	MAF HapMAP	Odds ratio	95% CI	p-hodnota
<i>MLH1</i>	rs1799977	A/G	0,75	0,35	5,571	3,023–10,270	< 0,0001
<i>CCNH</i>	rs2230641	A/G	0,61	0,20	6,256	3,319–11,790	< 0,0001
<i>ERCC6</i>	rs2228529	T/C	0,51	0,20	4,163	2,222–7,799	< 0,0001
<i>ERCC6</i>	rs2228526	T/C	0,51	0,20	4,163	2,222–7,799	< 0,0001
<i>MGMT</i>	rs12917	C/T	0,48	0,10	8,308	3,877–17,800	< 0,0001
<i>TDG</i>	rs4135113	G/A	0,23	0,03	9,658	2,795–33,380	< 0,0001

4.2.2. Validační studie asociací mezi MDS a vybranými genetickými polymorfismy

Potenciální asociace mezi výše zmíněnými polymorfismy a sklonem ke vzniku MDS byly validovány na populaci sestávající z 200 pacientů s MDS zahrnující nemocné se všemi podtypy a ze všech prognostických kategorií tohoto onemocnění. Kontrolní skupinu tvořilo 216 hematologicky zdravých a věkově srovnatelných osob českého původu.

Tato validační studie nepotvrdila vztah mezi žádným z výše uvedených jednonukleotidových polymorfismů a zvýšeným rizikem vzniku MDS. Vypočtené hodnoty odds ratio a p-hodnoty zjištěné pro jednotlivé polymorfismy shrnuje tabulka 4.4.

Tabulka 4.4 Ve validační studii nebyla potvrzena žádná z asociací mezi výše vybranými SNP a rizikem vzniku MDS. Pro výpočet odds ratio byla jako kontrolní skupina zvolena populace hematologicky zdravých, věkově srovnatelných, osob českého původu. (MAF – frekvence minoritní alely, 95% CI – interval spolehlivosti pro odds ratio, p-hodnota vypočtených odds ratio).

Gen	SNP	Genotyp	MAF pacienti	MAF kontroly	Odds ratio	95% CI	p -hodnota
<i>MLH1</i>	rs1799977	A/G	0,33	0,30	1,149	0,632–2,089	0,7609
<i>CCNH</i>	rs2230641	A/G	0,24	0,27	0,854	0,452–1,614	0,8538
<i>ERCC6</i>	rs2228529	T/C	0,24	0,27	0,854	0,452–1,614	0,8538
<i>ERCC6</i>	rs2228526	T/C	0,24	0,27	0,854	0,452–1,614	0,8538
<i>MGMT</i>	rs12917	C/T	0,16	0,19	0,8120	0,391–1,688	0,7102
<i>TDG</i>	rs4135113	G/A	0,03	0,01	3,062	0,313–29,960	0,6212

Pro detailní analýzu byly pacienti validační kohorty rozděleni podle podtypů MDS do skupiny zahrnující níže rizikové podtypy MDS RA, RARS, 5q-syndrom, skupiny zahrnující nemocné s RCMD a skupiny pacientů s RAEB-1, RAEB-2 a sekundární AML. Dále byli nemocní rozděleni do skupin podle prognostického systému IPSS-R a podle cytogenetických kategorií vycházejících z IPSS-R. Polymorfismus v genu *MLH1* (rs1799977) byl asociován se vznikem MDS ve skupině nemocných s rizikovým cytogenetickým nálezem definovaným jako kategorie poor a very poor dle cytogenetických kritérií IPSS-R (OR 2,870; $p = 0,0004$), viz tabulka 4.5.

Tabulka 4.5 Hodnoty odds ratio získané z validační studie ve skupině pacientů s nepříznivou a velmi nepříznivou cytogenetikou dle IPSS-R. Pro výpočet odds ratio byla jako kontrolní skupina zvolena populace hematologicky zdravých, věkově srovnatelných, osob českého původu. (MAF – frekvence minoritní alely, 95% CI – interval spolehlivosti pro odds ratio, p-hodnota vypočtených odds ratio).

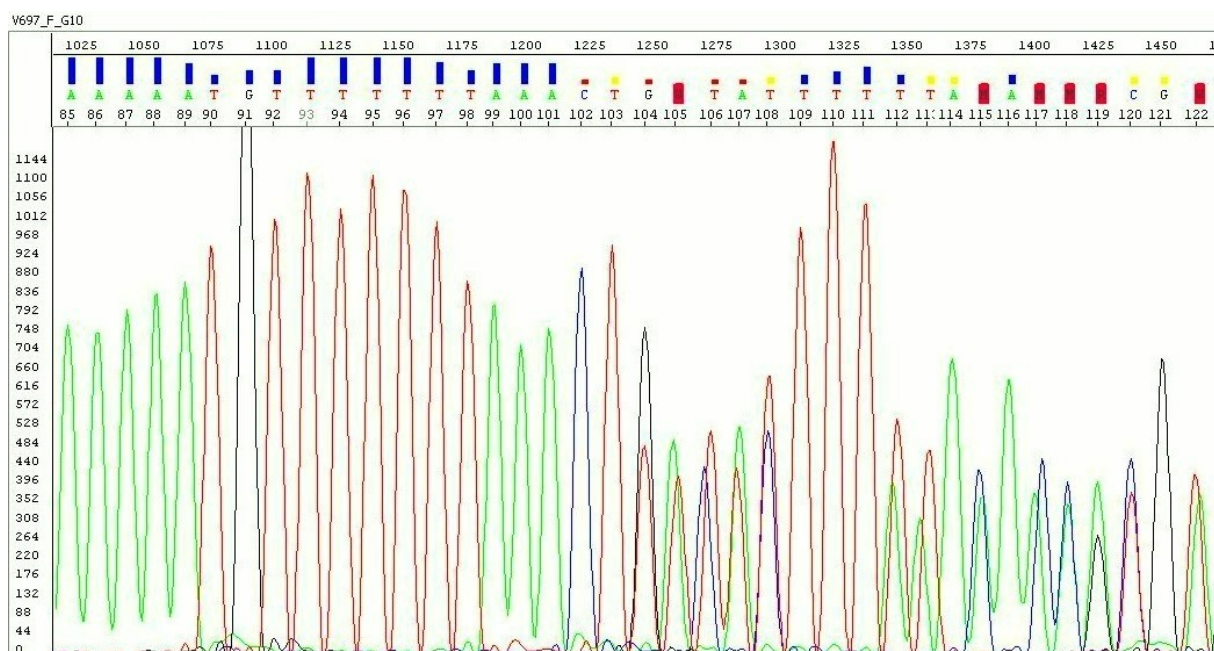
Gen	SNP	Genotyp	MAF pacienti	MAF kontroly	Odds ratio	95% CI	p-hodnota
<i>MLH1</i>	rs1799977	A/G	0,55	0,30	2,870	1,594–5,102	0,0004
<i>CCNH</i>	rs2230641	A/G	0,26	0,27	0,9499	0,507–1,781	1,0000
<i>ERCC6</i>	rs2228529	T/C	0,26	0,27	0,9499	0,507–1,781	1,0000
<i>ERCC6</i>	rs2228526	T/C	0,26	0,27	0,9499	0,507–1,781	1,0000
<i>MGMT</i>	rs12917	C/T	0,14	0,19	0,6940	0,326–1,476	0,4464
<i>TDG</i>	rs4135113	G/A	0,07	0,01	7,452	0,899–61,760	0,0649

4.2.3. Identifikace nových mutací v DNA reparačních genech u pacientů s MDS

Cíleným sekvenováním exonových oblastí 84 vybraných DNA reparačních genů (seznam genů viz tabulka 3.3) provedeným na skupině 16 pacientů s MDS byly v tomto souboru genů popsány čtyři nové genové mutace. U stejných pacientů byla navíc hodnocena exprese všech sekvenovaných genů DNA reparace, takže bylo možné určit vliv těchto mutací na expresi postižených genů.

V genu *XRCC2* byla v heterozygotní formě nalezena mutace charakteru posunu čtecího rámce (frameshift) způsobená delecí dvou párů bází v kodonu 263 (*XRCC2*: c.789_790delCA). Tato mutace byla identifikována u pacientky s diagnózou MDS RAEB-2. Mutovaná sekvence byla verifikována Sangerovým sekvenováním (obrázek 4.25). Současný výskyt této mutace v CD3 pozitivních T-lymfocytech, použitých jako kontrolní buněčná populace, signalizuje její zárodečný původ. Exprese genu *XRCC2* u pacientky s touto mutací byla signifikantně snížena (FC = -5,04).

Obrázek 4.25 Výsledky Sangerova sekvenování ukazující heterozygotní mutaci genu *XRCC2* s posunem čtecího rámce způsobenou delecí dvou párů bází v kodonu 263 (*XRCC2*: c.789_790delCA).



U dvou pacientů s prognosticky závažným MDS (nepříznivé a velmi nepříznivé riziko dle IPSS-R) byla nalezena synonymní substituční mutace v genu *PRKDC* (*PRKDC*: G/A; GRCh37.p13 pozice 44,800,153). Exprese mutovaného genu byla u těchto nemocných mírně

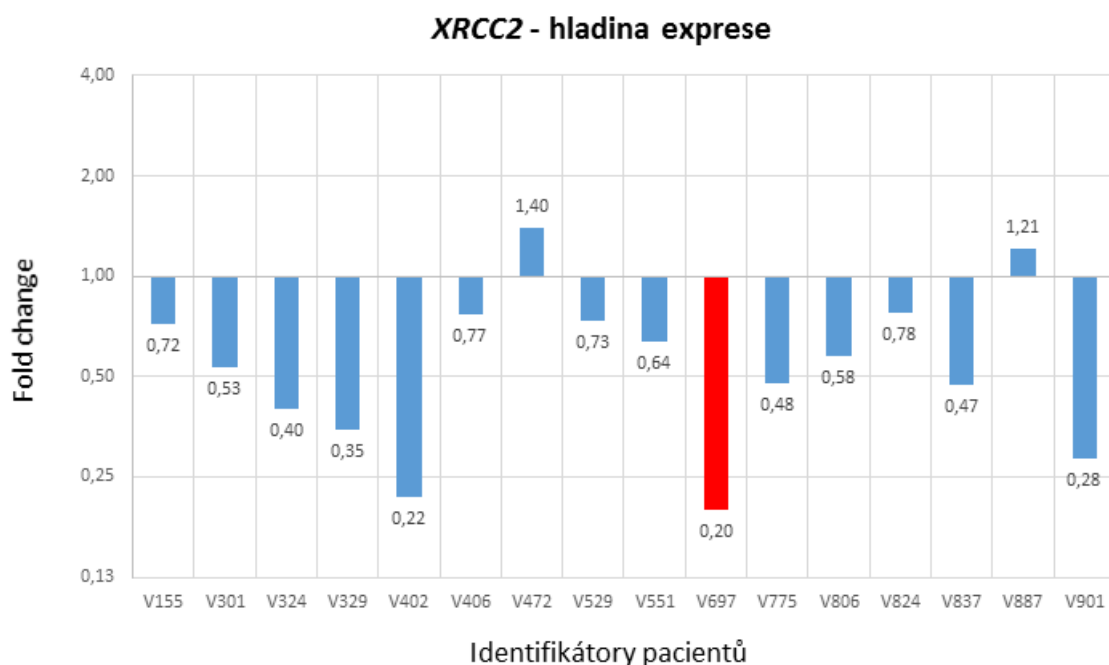
snížena ($FC = -1,14$ a $-1,43$). Pacient s MDS RCMD s prstenčitými sideroblasty a prognosticky středním rizikem (intermediate kategorie dle IPSS-R) byl nositelem dvou nově identifikovaných mutací, missense mutace v genu *SMUG1* (*SMUG1*: G/A; GRCh37.p13 pozice 54,576,006) a missense mutace v genu *XRCC1* (*XRCC1*: G/C; GRCh37.p13 pozice 44,056,320). Gen *SMUG1* měl u tohoto nemocného sníženou expresi ($FC = -1,43$), exprese druhého z mutovaných genů *XRCC1* byla nezměněna ($FC = +1,09$). Podle softwarového nástroje PolyPhen-2 predikujícího efekt missense mutací v lidském genomu (Adzhubei I. et al., 2013) jsou obě popsané mutace benigní s pravděpodobnostním skóre 0,013 (senzitivita: 0,96, specificita: 0,78).

4.2.4. Funkční důsledky nově popsané posunové mutace c.789_790delCA v genu *XRCC2*

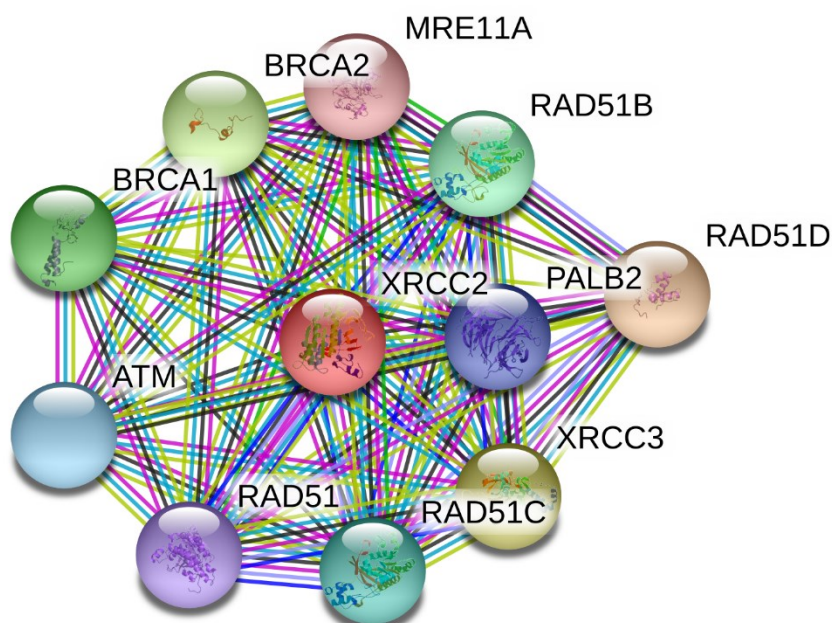
Gen *XRCC2* je lokalizován na dlouhém rameni 7. chromozomu. Námi popsaná mutace genu *XRCC2* (*XRCC2*: c.789_790delCA) vede k posunu čtecího rámce a předčasnému vytvoření stop kodonu, výsledkem je vznik zkráceného nefunkčního proteinu. Jak bylo zmíněno výše, mimo sekvenaci bylo u všech testovaných pacientů provedeno také měření exprese genů DNA reparace. To nám umožnilo porovnat expresi genu *XRCC2* u pacienta s nově popsanou mutací a expresi tohoto genu u nemocných s jinými cytogenetickými abnormalitami. Vzorky s nejvíce sníženou expresí pocházely od pacienta V697 s mutací genu *XRCC2*: c.789_790delCA ($FC = -5,04$), dále od pacienta V402 s monosomií chromozomu 7 ($FC = -4,58$) a nakonec od pacienta V901 s komplexními změnami karyotypu ($FC = -3,53$). Expresi genu *XRCC2* u testovaných pacientů ukazuje obrázek 4.26.

Nejbližší interakční partneři proteinu *XRCC2* byli identifikováni pomocí databáze proteinových interakcí STRING (Szklarczyk D. et al., 2015). Schéma proteinových interakcí ukazuje obrázek 4.27. Následně byla u pacienta nesoucího nově popsanou mutaci v genu *XRCC2* změřena hladina exprese genů kódujících tyto proteinové partnery. V následujícím výčtu jsou uvedeny tyto geny v abecedním pořadí spolu s relativním snížením hladiny jejich exprese (fold change): *ATM* ($FC = -1,88$), *BRCA1* ($FC = -2,57$), *BRCA2* ($FC = -3,63$), *MRE11A* ($FC = -2,35$), *RAD51* ($FC = -2,85$), *RAD51B* ($FC = -2,33$), *RAD51C* ($FC = -3,79$), *RAD51D* ($FC = -1,55$) a *RAD52* ($FC = -1,63$) (obrázek 4.28). Signifikantní snížení exprese genů kódujících interakční proteinové partnery proteinu *XRCC2* nebylo pozorováno u žádného dalšího ze studovaných pacientů včetně nemocných s monosomií chromozomu 7 nebo komplexním karyotypem.

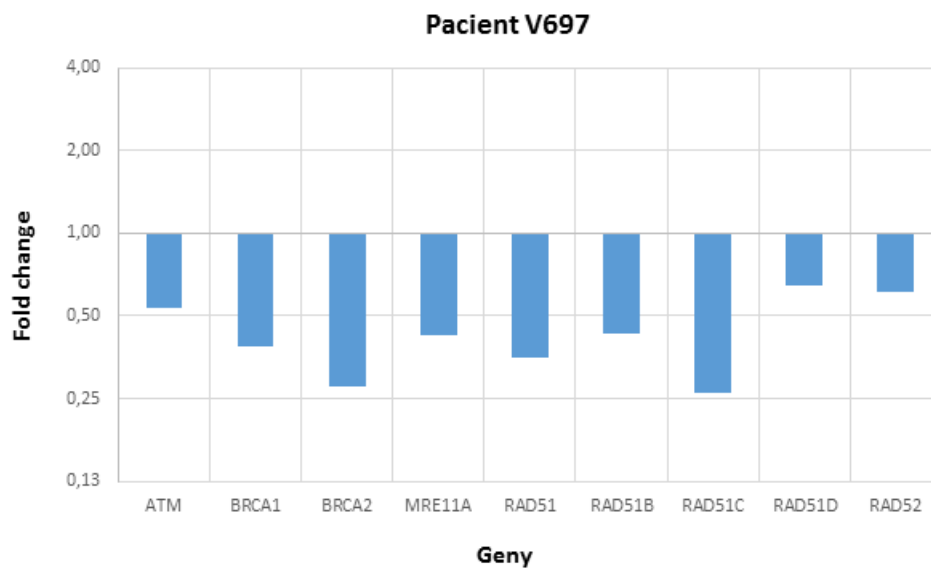
Obrázek 4.26 Exprese genu *XRCC2* u 16 pacientů jejichž DNA byla sekvenována. Pacient V697 (červený sloupec) je nemocný, u nějž byla detekována mutace *XRCC2*: c.789_790delCA; pacient V402 je nemocný s monosomií 7; pacient V901 má komplexní karyotyp.



Obrázek 4.27 Schéma interakcí proteinu *XRCC2* dle nástroje STRING (Szklarczyk et al., 2015).



Obrázek 4.28 Hladiny exprese genů kódujících proteinové funkční partnery proteinu XRCC2 u pacienta nesoucího mutaci *XRCC2*: c.789_790delCA. Exprese genu *PALB2* nebyla změřena.



5. Diskuze

5.1 Hodnocení exprese DNA reparačních genů u pacientů s MDS

Patogenetické mechanismy vedoucí ke vzniku a rozvoji myelodysplastického syndromu stále nejsou plně pochopeny. Na základně skutečnosti, že u většiny případů MDS je identifikována alespoň jedna z řady takzvaných myeloidních mutací (Bejar R. et al., 2011; Papaemmanuil E. et al., 2013; Haferlach T. et al., 2014) a časté přítomnosti cytogenetických alterací u tohoto onemocnění (Haase D. et al., 2007), se ve shodě s jinými autory (Zhou T. et al., 2013; Zhou T. et al., 2015) přikláníme k teorii, že MDS je onemocněním, na jehož vzniku se zásadním způsobem podílí genomická nestabilita. Tato genomická nestabilita je spojena s tendencí buněk k získávání mutací a šíření těchto mutací do dalších buněčných generací vlivem neschopnosti vypořádat se adekvátním způsobem s poškozením DNA (Zhou T. et al., 2015). Pouze malá část případů MDS může být uspokojivě vysvětlena jako důsledek nadměrného vystavení nejrůznějším, zejména zevním, mutagenům jako jsou gama záření, nejrůznější chemické látky nebo chemoterapeutika. Vznik maligní buňky a její další rozvoj vedoucí k vytvoření maligního buněčného klonu, který je zodpovědný za rozvoj MDS, musí tedy spočívat buď v poruše mechanismů odpovídajících na poškození DNA (DNA response) anebo vlastních mechanismů DNA reparace (DNA repair).

Srovnáním expresních profilů genů DNA reparace u pacientů v různých stádiích MDS a hematologicky zdravých kontrol jsme identifikovali 16 abnormálně exprimovaných genů. S využitím databází a analyzátorů buněčných drah (Rebhan M. et al., 1997; Szklarczyk D. et al., 2015) jsme byli schopni přiřadit tyto odlišně exprimované geny ke každé z hlavních drah mechanismu DNA reparace. K dráze opravy vyštěpením báze (BER) náležely abnormálně exprimované geny *APEX2*, *CCNO*, *FEN1*, *MPG* a *NEIL1*; mechanismus opravy vyštěpením nukleotidu (NER) byl zastoupen geny *XPA* a *XPC*; s opravou chybného párování (mismatch repair) byl spojen gen *EXO1*; u mechanismu opravy DNA homologní rekombinací byly postiženy geny *BRCA2*, *EXO1*, *RAD51*, *RPA3*, *XRCC2*, *XRCC3* a k poslední z hlavních drah DNA reparace, nehomolognímu spojování konců (NHEJ), bylo možno přiřadit geny *POLL*, *XRCC4*, *XRCC6*. Z počtu abnormálně exprimovaných genů je zřejmé, že nejvíce deregulovány jsou mechanismy BER a homologní rekombinace.

Možná úloha BER v patogenezi MDS je zvažována také v publikované literatuře (Jankowska A.M. et al., 2008; Zimmer S.N. et al. 2012). Hladina exprese jedné ze známých DNA glykosyláz asociovaných s BER dráhou, N-metylpurin DNA glykosylázy (*MPG*), byla

v námi zkoumaných vzorcích MDS pacientů významně zvýšena. Nejvyšší exprese tento gen dosahoval u pacientů s MDS vysokého rizika. Můžeme se domnívat, že tato deregulace může přispívat k hypermetylaci DNA, která je známa u pokročilého MDS (Khan H. et al., 2013).

Homologní rekombinace je vedle nehomologního spojování konců hlavním mechanismem zodpovědným za opravu dvouřetězcových zlomů DNA, nejzávažnějšího typu poškození této nukleové kyseliny. Předkládaná studie odhalila, že exprese genu *RAD51*, tedy klíčového faktoru této buněčné dráhy, a s ním spolupracujících genů *BRCA2*, *XRCC2*, *XRCC3* a *RPA3* je u pacientů s MDS deregulována a v pokročilých stádiích významně snížena, což naznačuje závažnou poruchu mechanismu homologní rekombinace u tohoto onemocnění. Stěžejní role *RAD51* rekombinázy a úzký funkční vztah k proteinům, se kterými při své činnosti kooperuje, jsou známy a široce studovány (Tambini C.E. et al., 2010). Geny *RAD51*, *XRCC2*, *BRCA2* a *RPA3* vykazovaly v provedené studii zvýšenou expresi v CD34+ buňkách kostní dřeně u MDS nízkého rizika (RA, RARS, 5q- syndrom) a současně trend postupného poklesu hladiny exprese směrem k závažnějším formám onemocnění s nejnižší expresí u vysoce rizikových forem MDS (RAEB-1, RAEB-2 a sekundární AML). Hladina exprese genů *RAD51*, *XRCC2* a *RPA3* negativně korelovala také se zhoršením prognózy onemocnění dle prognostického indexu IPSS-R a s rostoucím procentem myeloidních blastů v kostní dřeni, a byla pozitivně spojena s délkou celkového přežití pacientů. Podobné snížení exprese genů *RAD51* a *BRCA2* popsal ve svém článku také Pellagati (Pellagati A. et al., 2010).

Na základě získaných výsledků se lze domnívat, že zvýšená aktivita mechanismu homologní rekombinace pozorovaná u MDS nízkého rizika představuje odpověď hematopoetických buněk na vliv neznámého stresoru působícího v mikroprostředí kostní dřeně. Úloha takzvaného buněčného stresu na vznik mutací a rozvoj maligního klonu je v patogenezi MDS zmiňována také dalšími autory (Chung Y.J. et al., 2014; Gonçalves A.C. et al., 2015). Selhání této odpovědi, způsobené energetickým vyčerpáním reparačního mechanismu nebo nemožností dále zvyšovat aktivitu odpovědi úměrně sílícímu buněčnému stresu, vede k chybné opravě DNA a vzniku mutace, která buď iniciuje vznik patologického MDS klonu, nebo umožní jeho progresi. Porušení funkce homologní rekombinace v CD34+ buňkách se v průběhu onemocnění dle prezentovaných výsledků jeví jako progredující, což usnadňuje vznik nových mutací a chromozomálních lézí během evoluce patologického MDS klonu a vede k vývoji buněk s vysokou mírou genetické nestability. Role opravy dvouřetězcových zlomů homologní rekombinací se zdá být v tomto procesu stěžejní, neboť tento mechanismus opravuje zlomy velmi přesně a bez tvorby mutací. Při poklesu aktivity homologní rekombinace jsou buňky nuceny využít pro opravu zlomů druhou z buněčných

drah zodpovědných za opravu tohoto poškození, tedy nehomologní spojování konců, které sice obnoví kontinuitu rozlomené molekuly DNA a umožní replikaci genetické informace a rozdělení buňky, ale z podstaty svého fungování je tento mechanismus poměrně nepřesný a může přispívat ke vniku nových mutací. Popsaná teorie využívá široce přijímaného modelu klonální hematopoézy u MDS (Steensma D.P. et al., 2015) a může být také podpořena závěry jiných autorů, kteří zmiňují roli chybné opravy dvouřetězcových zlomů v myších modelech MDS (Omidvar N. et al., 2007) a podíl neefektivní opravy dvouřetězcových zlomů na vzniku myeloidních malignit (Broberg K. et al., 2007) a postterapeutické akutní myeloidní leukemie (Jacoby M.A. et al., 2014).

Získané výsledky byly potvrzeny stanovením hladiny exprese genů *RAD1* a *XRCC2* v sériových vzorcích pacientů s progresí myelodysplastického syndromu a známým mutačním profilem. Výrazná většina vyšetřovaných pacientů vykazovala pokles exprese sledovaných genů od časných k pokročilým stádiím svého onemocnění. Za povšimnutí stojí jistě také to, že v některých případech progresu MDS dochází po překročení hranice 30 % myeloidních blastů v kostní dřeni (tedy jde již o transformaci do AML) k opětovnému zvýšení hladiny exprese těchto sledovaných genů a tedy možné obnově funkce DNA reparačního mechanismu homologní rekombinace. Toto posílení DNA reparačních mechanismů může přispívat k rezistenci patologických buněk sekundární (z MDS vzniklé) AML a může představovat potenciální terapeutický cíl. K ověření této hypotézy je však třeba získat větší množství dat z velkého vzorku pacientů. Z důvodu malého počtu pacientů v našem vzorku jsme nebyli schopni provést spolehlivou analýzu vlivu mutačního statusu genu *TP53* na expresi genu *RAD51*.

Delece chromozomu číslo 7 nebo jeho dlouhého ramene del(7q) je jednou z nejčastějších chromozomálních lézí nacházených v karyotypu pacientů s MDS a její incidence činí 5–10 % u primárního MDS (Haase D. et al., 2007). Jeden ze studovaných genů, gen *XRCC2*, je lokalizován na dlouhém rameni 7. chromozomu v pozici 7q36.1 (Rebhan M. et al., 1997). Pacienti s monosomií chromosomu 7 nebo delecí 7q vykazovali nejnižší expresi tohoto genu z celé studované kohorty zahrnující i řadu nemocných s komplexními změnami karyotypu. Méně očekávaným výsledkem byla skutečnost, že u nemocných s abnormalitami 7. chromozomu došlo k podobnému poklesu exprese také u genu *RAD51*, který je lokalizován na 15. chromozomu v poloze 15q15.1 (Rebhan M. et al., 1997). Tento jev může být vysvětlen dříve popsanou úzkou funkční závislostí mezi proteiny RAD51 a XRCC2 (Tambini C.E. et al., 2010).

Jak bylo v textu zmíněno dříve, nízká exprese genu *RAD51* byla spojena s kratším celkovým přežitím nemocných s MDS. Prezentované výsledky jsou tedy ve shodě s prognostických skórovacím systémem IPSS-R, který přiřazuje ztrátu 7. chromozomu nebo delecí dlouhého ramene 7. chromozomu v kombinaci s jednou další cytogenetickou abnormalitou do prognosticky nepříznivé (poor) cytogenetické kategorie (Schanz J. et al., 2012). Podobně jsou dosažené výsledky ve shodě se systémem IPSS-R v případě cytogenetického nálezu delecce dlouhého ramene 20. chromozomu, který je řazen mezi nálezy prognosticky příznivé (good). Bylo zjištěno, že pacienti s MDS s izolovanou del(20q) v karyotypu mají hladinu exprese genů *RAD51* a *XRCC2* vyšší, než zbytek kohorty MDS pacientů a srovnatelnou s nemocnými s normálním karyotypem.

Imunohistochemické barvení k určení lokalizace RAD51 rekombinázy v hematopoetických buňkách provedené na histologických vzorcích nemocných s MDS ukázalo, že ve vzorcích MDS nízkého rizika byl protein přítomen v cytoplazmě buněk, avšak nikoli v jejich jádru; v případech MDS vysokého rizika byl pak protein přítomen jak v cytoplazmě, tak v buněčném jádru, kde byla jeho koncentrace průměrně vyšší, než v cytoplazmě. Uvážíme-li předchozí zjištění prokazující odlišné hladiny exprese genů DNA reparace homologní rekombinací v různých stádiích MDS, můžeme tyto imunohistochemické výsledky vysvětlit následující hypotézou.

Rozpoznání poškození DNA (DNA damage response) a iniciální kroky systému homologní rekombinace jsou zřejmě v buňkách MDS v pořádku, neboť přítomnost RAD51 rekombinázy v cytoplazmě buněk MDS nízkého i vysokého rizika svědčí pro to, že bylo rozpoznáno poškození DNA, došlo k transkripci genu *RAD51* a jeho translaci do proteinu. Negativita proteinu RAD51 v buněčném jádru u MDS nízkého rizika svědčí o správném provedení opravy DNA, tím je utlumen iniciální impuls upozorňující na poškození DNA a je současně utlumena další transkripce a translace *RAD51*, v jádře mezitím dochází k rozvolnění nukleoproteinových komplexů (RAD51 fokusy) v místě opravy poškozené DNA a extrakci zbylého proteinu z jádra.

I přes výše popsané snížení hladiny exprese genu *RAD51* je v buňkách MDS vysokého rizika stále určité množství RAD51 rekombinázy produkováno. Impuls rozpoznávající poškozenou DNA přitahuje reparační proteiny do buněčného jádra, tedy do místa kde se nachází poškozená DNA, nedochází ovšem k tvorbě nukleoproteinových komplexů (RAD51 fokusů), ať už v důsledku neschopnosti vázat poškozenou DNA (deficit proteinu RPA3) nebo neschopnosti sestavení nukleoproteinového komplexu (deficit proteinů XRCC2, či BRCA2). Poškození DNA tedy není adekvátně opraveno a neodchází k utlumení iniciálního impulsu

signalizujícího poškození DNA, což vede k další produkci RAD51 a jeho přesunu do jádra, kde se následně akumuluje. Úlohu proteinů XRCC2 a BRCA2 pro správnou funkci RAD51 rekombinázy uvádějí také další autoři (Tambini C.E. et al., 2010; Nakada S. et al., 2012)

5.2. Sekvenační analýza genů DNA reparace u pacientů s MDS

Jak jsme již zmínili výše, počet a variabilita genetických a cytogenetických aberací popsanych v posledních letech u pacientů s MDS, a současně také naše výsledky získané při hodnocení exprese DNA reparačních genů u nemocných s tímto onemocněním, podporují představu MDS jako onemocnění způsobeného nestabilitou genomu (Zhou T. et al., 2015). Již dlouhou dobu jsou známy mutace genu *TP53* a jejich vztah k MDS, jako příklad lze uvést, naším týmem taktéž zkoumané, výrazné zhoršení prognózy nemocných se syndromem delece 5q a přítomnou mutací *TP53* (Belickova M. et al., 2016). Dosud však u MDS nebyly popsány žádné mutace v genech přímo se účastnících na mechanismu DNA reparace. Gen *TP53* je totiž spíše zapojen do mechanismu odpovídajícího na poškození DNA (DNA damage response), který předchází vlastní opravě DNA (Jädersten M. et al., 2011; Kulasekararaj A.G. et al., 2012). Jedním z cílů práce proto bylo, pokusit se identifikovat genetické varianty v genech přímo zúčastněných na DNA reparaci a popsat jejich vztah k rozvoji MDS.

Použitím metody cíleného sekvenování exonových oblastí vybraných DNA reparačních genů bylo identifikováno šest jednonukleotidových polymorfismů s potenciálním vztahem k rozvoji MDS. Nejvýznamnější souvislost s MDS, vyjádřená hodnotou odds ratio 4,409, byla pozorována u polymorfismu v genu *TDG* s označením rs4135113. Tento polymorfismus byl přítomen pouze v heterozygotní formě a s velmi malou frekvencí. Thymin DNA glykosyláza (TDG) je jednou z glykosyláz účastnících se vyštěpení chybně párované báze v systému BER a má vliv také v demetylacii DNA (Nakamura T. et al., 2017). Polymorfismus rs12917 v genu *MGMT* byl ve zkoumané skupině nemocných zjištěn pouze v heterozygotní formě, hodnota odds ratio činila 3,329. Protein MGMT brání buňky proti toxicitě a mutagennímu působení alkylačních činidel (Rebhan M. et al., 1997). Polymorfismus rs2230641 genu *CCNH* byl u pacientů nalezen jak v homozygotní, tak v heterozygotní formě, odds ratio mělo hodnotu 2,349. Protein cyklin H kódovaný tímto genem patří do rodiny cyklinů kontrolujících přechod mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu (Andersen G. et al., 1997). Dva polymorfismy genu *ERCC6*, rs2228529 a rs2228526, se u nemocných vyskytovaly vždy společně a to jak v homozygotní, tak heterozygotní formě, hodnoty odds ratio pro ně činily 2,061 a 2,154. Protein ERCC6 je zapojen do systému NER spojeného s transkripcí (Wood R.D. et al., 2005). Poslední z polymorfismů, rs1799977,

představuje variantu genu *MLH1*. Tento polymorfismus byl u vyšetřovaných pacientů nalezen jak v homozygotním, tak v heterozygotním stavu s asociací k MDS vyjádřenou odds ratio 1,857. Protein MLH1 je součástí systému mismatch repair (Wood R.D. et al., 2005). U většiny z výše zmíněných genů byly popsány genetické varianty asociované s rozvojem onkologického onemocnění, polymorfismy genu *MGMT* jsou například spojovány s rozvojem karcinomu štítné žlázy (Sandler J.E. et al., 2018) nebo glioblastomu (Rapkins R.W. et al., 2015) a SNP v genu *ERCC6* s případy karcinomu žaludku (Liu J. et al., 2016). V předložené studii nebyl detekován žádný z genových polymorfismů popsaných u pacientů s MDS v recentních pracích Ribeirovy skupiny (Ribeiro H.L. Jr. et al., 2014; Ribeiro H.L. Jr. et al., 2015).

Validační studie, v níž byly frekvence minoritních alel (MAF) pro výše uvedené polymorfismy určeny z populace osob českého původu, nepotvrdila souvislost mezi výše vytipovanými polymorfismy a MDS. Statisticky významnou se ukázala pouze asociace polymorfismu rs1799977 v genu *MLH1* s rozvojem MDS ve skupině pacientů s rizikovým cytogenetickým nálezem (nepříznivý a velmi nepříznivý karyotyp dle IPSS-R). Průkaz vztahu mezi polymorfismem rs1799977 a rizikem rozvoje malignity s nepříznivým cytogenetickým nálezem je ve shodě se závěry dalších autorů, kteří popsali souvislost tohoto polymorfismu například s karcinomem prostaty (Langeberg W.J. et al., 2010) nebo difúzním velkobuněčným B lymfomem (Rossi D. et al., 2011), a to zejména s agresivnějšími formami těchto malignit a nižším celkovým přežitím pacientů. Mutace v genu *MLH1* byly nalezeny u nemocných s kolorektálním karcinomem (Milanizadeh S. et al., 2013; Ward R.L. et al., 2013).

V souboru 84 klíčových DNA reparačních genů (seznam genů viz tabulka 3.3) byly u nemocných s MDS metodami sekvenování nové generace identifikovány čtyři nové genetické mutace. Jako nejvýznamnější z těchto nově popsaných mutací se jevila mutace genu *XRCC2* s posunem čtecího rámce způsobená delecí dvou párů bází v kodonu 263 (*XRCC2*: c.789_790delCA). Tuto mutaci jsme v heterozygotní podobě zjistili u 62 leté pacientky s MDS RAEB-2. IPSS-R skóre nemocné stanovené při diagnóze činilo 5,5 (high risk kategorie) a její celkové přežití od stanovení diagnózy bylo 17,1 měsíců. Mutace byla původně detekována v CD34+ buňkách kostní dřeně, současná přítomnost mutace v CD3+ lymfocytech periferní krve svědčila pro její zárodečný původ. Bohužel nebyly k dispozici krevní vzorky rodinných příslušníků k provedení mutační analýzy v rodině pacientky. Hladina exprese genu *XRCC2* byla u pacientky s touto mutací čtyřnásobně snížena ve srovnání s hladinou exprese u zdravých kontrol a byla srovnatelná s expresí zjištěnou u pacientů s monosomií 7. chromozomu nebo komplexním karyotypem. V předchozí části práce byla

přítom zjištěna signifikantně nižší hladina exprese genu *XRCC2* ve skupině MDS pacientů s delecí chromosomu 7 ve srovnání s ostatními pacienty s MDS. Snížení hladiny genové exprese bylo u této pacientky také prokázáno u genů funkčně spojených s mutovaným genem *XRCC2*, tedy genů *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MRE11A*, *RAD51*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* a *RAD52*. Tento poznatek zdůrazňuje důležitost genu *XRCC2* v systému DNA reparační závislém na *RAD51* rekombináze (O'Regan P. et al., 2001; Tambini C.E. et al., 2010). Polymorfismus v genu *XRCC2* a jeho souvislost s rozvojem kolorektálního karcinomu popsal ve své práci Cetinkunar (Cetinkunar S et al., 2015). Bylo také zjištěno, že vzácné mutace genu *XRCC2* zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu (Park D.J. et al., 2012; Peltari L.M. et al., 2015). Všechny tyto poznatky naznačují, že genetické varianty genu *XRCC2* jsou spojeny s rizikem rozvoje maligního onemocnění a že poškození tohoto genu má vliv na expresi genů zapojených zejména do dráhy opravy DNA homologní rekombinací.

Další nově popsaná mutace, missense mutace v genu *XRCC1*, vedla ke změně kodonu GCT na CCT a substituční záměně aminokyseliny alaninu za prolin. Missense mutace v genu *SMUG1* způsobila změnu kodonu ATG na ATA a záměnu methioninu za izoleucin. Tato mutace byla současně spojena se sníženou expresí postiženého genu. Obě mutace se dle prediktorového nástroje PolyPhen jeví jako benigní (Adzhubei I. et al., 2013). Protein *XRCC1* je zapojen do opravy jednořetězcových zlomů DNA způsobených vlivem ionizujícího záření nebo alkylačních činidel (Wong HK, Wilson DM 3rd., 2005). Spojitost mezi polymorfismem v genu *XRCC1* a rizikem vzniku leukémie prokázal ve své studii Wang (Wang Y. et al., 2003). Glykosyláza *SMUG1* je součástí dráhy BER a zodpovídá za odstranění uracilu z jedno- a dvouřetězcové molekuly DNA (Pettersen H.S. et al., 2007). Již dříve bylo publikováno, že nízké hladiny transkriptu *SMUG1* mohou narušit reparaci DNA a zvýšit tak frekvenci mutací (Kemmerich K. et al., 2012). Poslední z popsaných mutací, synonymní záměna v genu *PRKDC* byla identifikována u dvou pacientů. Gen *PRKDC* kóduje kinázu s důležitou funkcí při opravě dvouřetězcových zlomů DNA a při V(D)J rekombinaci v leukocytech. Mutace v tomto genu byly popsány u pacientů s imunodeficiencí (Mathieu A.L. et al., 2015).

6. Závěry

Předložená studie přináší nové poznatky o regulaci DNA reparačních mechanismů v hematopoetických buňkách nemocných s diagnózou myelodysplastického syndromu. Ukazuje, že exprese DNA reparačních genů, zejména *RAD51* a *XRCC2*, klíčových faktorů v systému opravy dvouřetězcových zlomů DNA homologní rekombinací, je v CD34+ buňkách kostní dřeně u MDS deregulována a vykazuje specifický vzorec s ohledem na podtypy MDS a prognostické kategorie. Porucha funkce DNA reparace se zdá být v průběhu onemocnění progredující, což umožňuje tvorbu a akumulaci nových genetických mutací během vývoje MDS buněčného klonu a nakonec vznik vysoce agresivních maligních buněk vedoucích k rozvoji akutní leukemie s omezenou odpovědí na chemoterapii. Multivariantní analýza identifikovala procento myeloidních blastů v kostní dřeni, cytogenetickou kategorii dle kritérií IPSS-R a hladinu exprese genu *RAD51* při diagnóze jako signifikantní nezávislé prognostické faktory pro celkové přežití nemocných s MDS. Imunohistochemická analýza prokázala akumulaci proteinu RAD51 v buněčném jádře u pokročilého MDS, což lze vysvětlit neschopností opravy poškozené DNA z důvodu neadekvátního sestavení reparačního nukleoproteinového komplexu. K ověření této hypotézy jsou potřeba další *in vitro* analýzy RAD51 rekombinázy a s ní kooperujících proteinů, stejně jako studie mapující vznik RAD51 fokusů *in vivo*.

Ve své druhé části využívající metod sekvenace DNA přinesla studie popis čtyř nových mutací v genech DNA reparace u MDS, z nichž zejména mutace genu *XRCC2* s posunem čtecího rámce a vznikem zkráceného, nefunkčního proteinu se jeví být přínosnou pro lepší pochopení patogeneze onemocnění. Sekvenační analýza prokázala přítomnost genetických variant DNA reparačních genů, které mohou být spojeny se zvýšeným rizikem vzniku MDS. U jedinců nesoucích ve své genetické výbavě tyto varianty může být ovlivněna schopnost a kapacita buněčné opravy DNA, což může přispět k rozvoji onemocnění.

Závěrem tedy lze konstatovat, že oba hlavní cíle studie zmíněné ve druhé kapitole této práce byly naplněny a obě definované hypotézy se ve svém základu ukázaly jako pravdivé.

První hypotézu, předpokládající že exprese genů DNA reparace je u nemocných s MDS snížena, což vede k nedostatečné opravě poškození DNA v hematopoetické buňce s následkem vzniku a hromadění mutací, je nutno poupravit v nepřesném předpokladu snížené exprese DNA reparačních genů. Dle získaných výsledků je exprese klíčových genů sice deregulována, ale snížena až v pokročilých fázích onemocnění a naopak zvýšena v počátku

choroby. Toto počáteční zvýšení lze vysvětlit snahou buňky o zvýšení kapacity DNA reparace v podmínkách zvýšeného buněčného stresu panujícího v mikroprostředí kostní dřeně u MDS.

Druhá hypotéza hovoří o existenci polymorfismů v genech DNA reparace, které se v určité frekvenci vyskytují ve zdravé populaci a predisponují ke vzniku MDS snížením aktivity DNA reparace. Existenci takovýchto polymorfismů předložená studie potvrzuje, ovšem k jednoznačnému prokázání statisticky významné vazby mezi některými polymorfismy DNA reparačních genů a zvýšeným rizikem vzniku MDS jsou potřeba další studie využívající sekvenování nové generace prováděné na větších skupinách pacientů.

Seznam použité literatury

- Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 7:Unit7.20.
- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*. 2006;124(2):301–313.
- Andersen G, Busso D, Poterszman A, et al. The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features. *EMBO J*. 1997;16(5):958–967.
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55:373–399.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–2405.
- Aul C, Bowden DT, Yoshida Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 1998;83(1):71–86.
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496–2506.
- Belickova M, Merkerova MD, Stara E, et al. DNA repair gene variants are associated with an increased risk of myelodysplastic syndromes in a Czech population. *J Hematol Oncol*. 2013;6:9.
- Belickova M, Vesela J, Jonasova A, et al. TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2016;7(24):36266–36279.
- Belickova M, Vesela J, Votavova H, et al. Mutational Screening for Predictive Profiles of Progression in Myelodysplastic Syndrome. In: 58. ASH Annual Meeting; 2016 Dec 3–6; San Diego, CA, Abstract nr. 1983.
- Bělohávková P, Červinek L. Myelodysplastický syndrom: Informační příručka pro pacienty. 2. vydání, ARTAX: Brno, 2014.
- Bělohávková P, Červinek L. Myelodysplastický syndrom: Informační příručka pro pacienty. 3. vydání, ARTAX: Brno, 2018.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 1982;51(2):189–199.
- Broberg K, Hoglund M, Gustafsson C, et al. Genetic variant of the human homologous recombination-associated gene RMI1 (S455N) impacts the risk of AML/MDS and malignant melanoma. *Cancer Lett*. 2007;258(1):38–44.

Burney S, Caulfield JL, Niles JC, et al. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res.* 1999;424(1–2):37–49.

Cetinkunar S, Gok I, Celep RB, et al. The effect of polymorphism in DNA repair genes RAD51 and XRCC2 in colorectal cancer in Turkish population. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(2):2649–2655.

Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidini-isothiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156–159.

Chung YJ, Robert C, Gough SM, et al. Oxidative stress leads to increased mutation frequency in a murine model of myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 2014;38(1):95–102.

Cioc AM, Wagner JE, MacMillan ML, et al. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: Morphologic and cytogenetic characteristics. *Am J Clin Pathol.* 2010;133(1):92–100.

Costa RM, Chigancas V, Galhardo Rda S, et al. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.* 2003;85(11):1083–1099.

Čermák J. Myelodysplastický syndrom, v Pospíšilová D, Dvořáková D, Mayer J, et al. Molekulární hematologie, 1. vydání, Galén, Praha 2013, 194–196.

Dexheimer TS. DNA repair pathways and mechanisms, in Mathews LA, Cabarcas SM, Hurt EM. *DNA Repair of Cancer Stem Cells.* 1st edition, Springer Science+Business Media, Dordrecht, Nizozemí, 2013, 19–29.

Fajkus J, Fajkusová L. Změny genetické informace – mutace a opravy DNA, v Pospíšilová D, Dvořáková D, Mayer J, et al. Molekulární hematologie, 1. vydání, Galén, Praha 2013, 33–43.

Forget AL, Kowalczykowski SC. Single-molecule imaging brings Rad51 nucleoprotein filaments into focus. *Trends Cell Biol.* 2010;20(5):269–276.

Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2012;87(7):692–701.

Gonçalves AC, Cortesão E, Oliveiros B, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction play a role in myelodysplastic syndrome development, diagnosis, and prognosis: A pilot study. *Free Radic Res.* 2015;49(9):1081–1094.

Greenberg P, Cox C, LeBeau M, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89(6):2079–2088.

Greenberg P L, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454–2465.

Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: Evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 2007;110(13):4385–4395.

- Haferlach T, Nagata Y, Grossman V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes, *Leukemia*. 2014;28(2):241–247.
- Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(12):958–970.
- Heisig P. Type II topoisomerases--inhibitors, repair mechanisms and mutations. *Mutagenesis*. 2009;24(6):465–469.
- Iwanaga M, Hsu WL, Soda M, et al. Risk of myelodysplastic syndromes in people exposed to ionizing radiation: A retrospective cohort study of Nagasaki atomic bomb survivors. *J Clin Oncol*. 2011;29(4):428–434.
- Jacobs AL, Schar P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*. 2012;121(1):1–20.
- Jacoby MA, de Jesus Pizarro RE, Shao J, et al. The DNA double-strand break response is abnormal in myeloblasts from patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014;28(6):1242–1251.
- Jädersten M, Saft L, Smith A et al. *TP53* mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1971–1979.
- Jankowska AM, Gondek LP, Szpyrka H, et al. Base excision repair dysfunction in a subgroup of patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2008;22(3):551–558.
- Joshi D, Korgaonkar S, Shanmukhaiah C, et al. Association of XPD (Lys751Gln) and XRCC1 (Arg280His) gene polymorphisms in myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*. 2016;95(1):79–85.
- Kefala M, Papageorgiou SG, Kontos CK, et al. Increased expression of phosphorylated NBS1, a key molecule of the DNA damage response machinery, is an adverse prognostic factor in patients with de novo myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2013;37(11):1576–1582.
- Kemmerich K, Dingler FA, Rada C, et al. Germline ablation of SMUG1 DNA glycosylase causes loss of 5-hydroxymethyluracil- and UNG-backup uracil-excision activities and increases cancer predisposition of Ung^{-/-}Msh2^{-/-} mice. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(13):6016–6025.
- Khan H, Vale C, Bhagat T, et al. Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*. 2013;50(1):16–37.
- Kulasekararaj A, Smith AE, Mian SA, et al. *TP53* mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol*. 2013;160(5):660–672.
- Langeberg WJ, Kwon EM, Koopmeiners JS, et al. Population-based study of the association of variants in mismatch repair genes with prostate cancer risk and outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(1):258–264.

- Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 2008;18(1):85–89.
- Lindahl T, Barnes DE. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2000;65:127–133
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402–408.
- Liu J, Deng N, Xu Q, et al. Polymorphisms of multiple genes involved in NER pathway predict prognosis of gastric cancer. *Oncotarget.* 2016;7(30):48130–48142.
- Leone G, Fianchi L, Pagano L, et al. Incidence and susceptibility to therapy-related myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact.* 2010;184(1–2):39–45.
- Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes, *Am J Med.* 2012;125(7 Suppl):S2–S5.
- Malcovati L, Hellstöm-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and Treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood.* 2013;122(17):2943–2964.
- Martino R, Iacobelli S, Brand R, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2006;108(3):836–846.
- Mathieu AL, Verronese E, Rice GI, et al. PRKDC mutations associated with immunodeficiency, granuloma, and autoimmune regulator-dependent autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(6):1578–1588.e5.
- Mayer J, et al. Léčebné postupy v hematologii. 1. vydání, Česká hematologická společnost ČLS JEP, Brno 2016.
- McIlwraith MJ, Vaisman A, Liu Y, et al. Human DNA polymerase η promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell.* 2005;20(5):783–792.
- Milanizadeh S, Khanyaghma M, Haghighi MM, et al. Molecular analysis of imperative polymorphisms of MLH1 gene in sporadic colorectal cancer. *Cancer Biomark.* 2013;13(6):427–432.
- Milne I, Stephen G, Bayer M, et al. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in Bioinformatics,* 2013;14(2):193–202.
- Nakada S, Yonamine RM, Matsuo K. RNF8 Regulates Assembly of RAD51 at DNA Double-Strand Breaks in the Absence of BRCA1 and 53BP1. *Cancer Res.* 2012;72(19):4974–4983.
- Nakamura T, Murakami K, Tada H, et al. Thymine DNA glycosylase modulates DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and independent mechanisms. *Genes Cells.* 2017;22(4):392–405.

- Nazha A, Narkhede M, Radivoyevitch T, et al. Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2016;30(11):2214–2220.
- Omidvar N, Kogan S, Beurlet S, et al. BCL-2 and mutant NRAS interact physically and functionally in a mouse model of progressive myelodysplasia. *Cancer Res*. 2007;67(24):11657–11667.
- O'Regan P, Wilson C, Townsend S, et al. XRCC2 is a nuclear RAD51-like protein required for damage-dependent RAD51 focus formation without the need for ATP binding. *J Biol Chem*. 2001;276(25):22148–22153.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616–3627.
- Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2010;24(4):756–764.
- Park DJ, Lesueur F, Nguyen-Dumont T, et al. Rare mutations in *XRCC2* increase the risk of breast cancer. *Am J Hum Genet*. 2012;90(4):734–739.
- Parker JE, Shafi T, Pagliuca A, et al. Allogeneic stem cell transplantation in the myelodysplastic syndromes: interim results of outcome following reduced-intensity conditioning compared with standard preparative regimens. *Br J Haematol*. 2002;119:144–154.
- Pelttari LM, Kiiski JI, Ranta S, et al. RAD51, XRCC3, and XRCC2 mutation screening in Finnish breast cancer families. *Springerplus*. 2015;4:92.
- Pettersen HS, Sundheim O, Gilljam KM, et al. Uracil–DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(12):3879–3892.
- Rapkins RW, Wang F, Nguyen HN, et al. The MGMT promoter SNP rs16906252 is a risk factor for MGMT methylation in glioblastoma and is predictive of response to temozolomide. *Neuro Oncol*. 2015;17(12):1589–1598.
- Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes, *Nat. Rev. Cancer*. 2001;12:849–859.
- Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, et al. GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases. *Trends in Genetics*. 1997;13(4):163.
- Ribeiro HL Jr, de Oliveira RTG, Maia AR, et al. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol*. 2015;33(4):220–228.
- Ribeiro HL Jr, Soares Maia AR, Costa MB, et al. Influence of functional polymorphisms in DNA repair genes of myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2016;48:62–72.

- Rossi D, Rasi S, Di Rocco A, et al. The host genetic background of DNA repair mechanisms is an independent predictor of survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2011;117(8):2405–2413.
- Sandler JE, Huang H, Zhao N, et al. Germline Variants in DNA Repair Genes, Diagnostic Radiation, and Risk of Thyroid Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27(3):285–294.
- Santiago SP, Junior HLR, de Sousa JC, et al. New polymorphisms of Xeroderma Pigmentosum DNA repair genes in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2017;58:73–82.
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. 2007;450(7169):509–514.
- Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, et al. C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2012;26(2):303–311.
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):820–829.
- Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, et al. Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2004;10(8):2675–2680.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(1):308–311.
- Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res*. 2008;18(1):64–72.
- Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9–16.
- Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 1998;2(2):223–232.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed. IARC Press: Lyon, France, 2008.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D447–452.
- Tambini CE, Spink KG, Ross CJ, et al. The importance of XRCC2 in RAD51-related DNA damage repair. *DNA Repair (Amst)*. 2010;9(5):517–525.
- Teer JK, Green ED, Mullikin JC, et al. VarSifter: visualizing and analyzing exome-scale sequence variation data on a desktop computer. *Bioinformatics*. 2012;15;28(4):599–600.

van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double stranded break connection. *Nat Rev Genet*. 2001;2(3):196–206.

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*. 2001;412(6847):607–614.

Ward RL, Dobbins T, Lindor NM, et al. Identification of constitutional MLH1 epimutations and promoter variants in colorectal cancer patients from the Colon Cancer Family Registry. *Genet Med*. 2013;15(1):25–35.

Wang Y, Spitz MR, Zhu Y, et al. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair (Amst)*. 2003;12;2(8):901–908.

Wong HK, Wilson DM 3rd. XRCC1 and DNA polymerase beta interaction contributes to cellular alkylating-agent resistance and single-strand break repair. *J Cell Biochem*. 2005;95(4):794–804.

Wood RD, Mitchell M, Lindahl T. Human DNA repair genes, 2005. *Mutation Research*. 2005;577(1–2):275–283.

Zimmer SN, Lemieux ME, Karia BP, et al. Mice heterozygous for CREB binding protein are hypersensitive to gamma-radiation and invariably develop myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm. *Exp Hematol*. 2012;40(4):295–306.e5.

Zharkov DO. Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(10):1544–1565.

Zhou T, Hasty P, Walter CA, et al. Myelodysplastic syndrome: An inability to appropriately respond to damaged DNA? *Exp Hematol*. 2013;41(8):665–674.

Zhou T, Chen P, Gu J, et al. Potential relationship between inadequate response to DNA damage and development of myelodysplastic syndrome. *Int J Mol Sci*. 2015;16(1):966–989.

Internetové zdroje

Gene cards: www.genecards.org.

NCBI: Variation Viewer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/>.

Zdroje obrázků:

Obrázek 1.1: Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616–3627.

Obrázek 1.2: Bejar R, Steensma D. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014;124(18):2793–2803.

Obrázek 1.3: Toss A, Cortesi L. Molecular Mechanisms of PARP Inhibitors in BRCA-related Ovarian Cancer. *J Cancer Sci Ther*. 2013;5:409–416.

Obrázek 1.4: Leyns L, Gonzalez L. Genomic Integrity of Mouse Embryonic Stem Cells, in Sato K.I. Embryogenesis. IntechOpen. 2012:332–358.

Dostupné z webu: <https://www.intechopen.com/books/embryogenesis/genomic-integrity-of-mouse-embryonic-stem-cells>.

Obrázek 1.5: Olsen AK, Lindeman B, Wiger R, et al. How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;207(2 Suppl):521–531.

Obrázek 1.6: Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2008;129(7–8):391–407.

Obrázek 1.7: Brochier C, Langley B. Chromatin modifications associated with DNA double-strand breaks repair as potential targets for neurological diseases. *Neurotherapeutics*. 2013;10(4):817–830.

Seznam publikací autora

IF odečten ke dni 26. 8. 2018

Publikace k tématu disertace

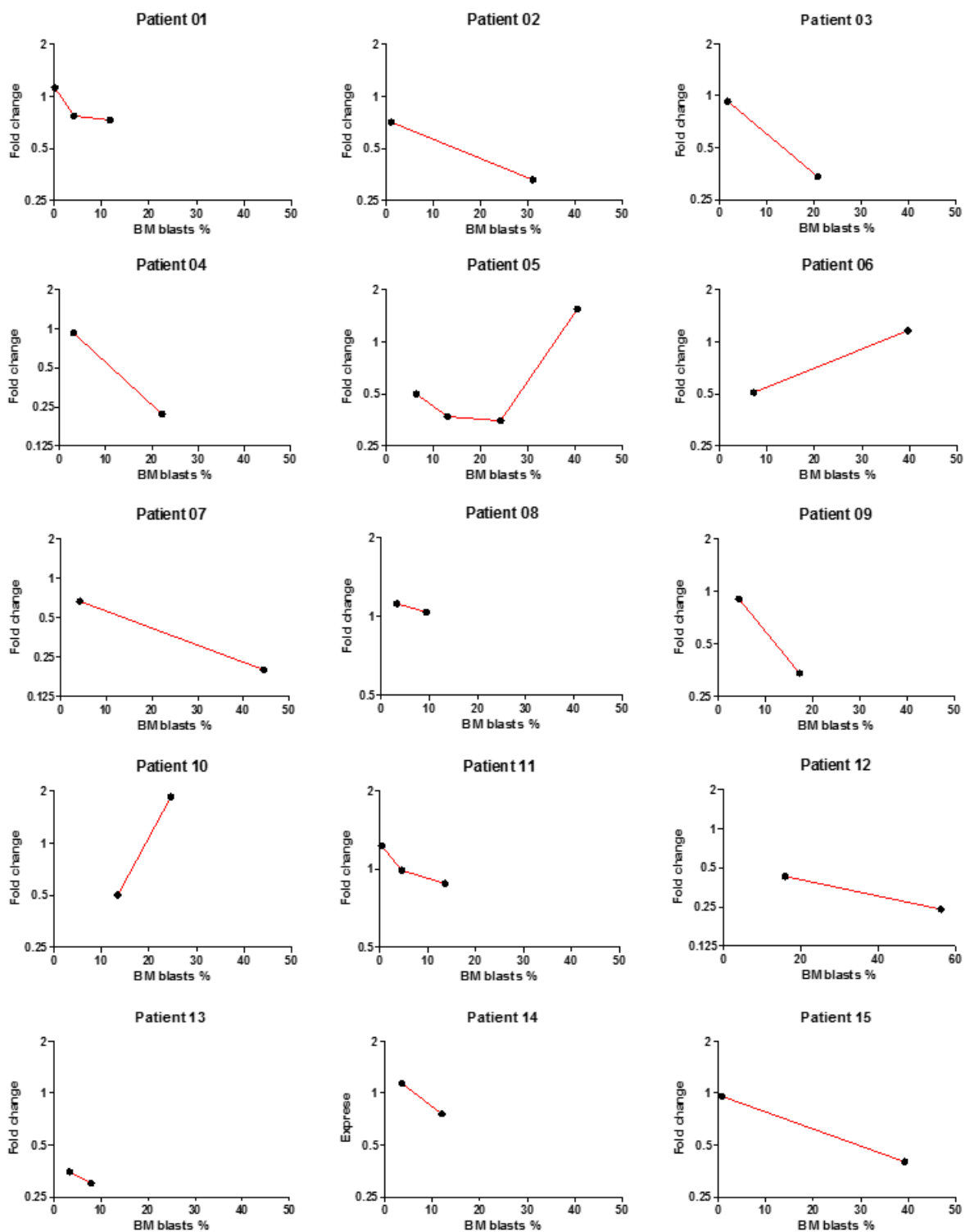
- **Valka J**, Vesela J, Votavova H, Dostalova-Merkerova M, Horakova Z, Campr V, Brezinova J, Zemanova Z, Jonasova A, Cermak J, Belickova M. Differential expression of homologous recombination DNA repair genes in the early and advanced stages of myelodysplastic syndrome. *Eur J Haematol*. 2017;99(4):323331. **IF = 2,595**
- **Valka J**, Vesela J, Votavova H, Dostalova-Merkerova M, Urbanova Z, Jonasova A, Cermak J, Belickova M. Genetic variant screening of DNA repair genes in myelodysplastic syndrome identifies a novel mutation in the XRCC2 gene. *Oncol Res Treat* (under review). Submitted 2018-06-13. **IF = 1,494**
- Belickova M, Vesela J, Jonasova A, Pejsova B, Votavova H, Merkerova MD, Zemanova Z, Brezinova J, Mikulenkova D, Lauermannova M, **Valka J**, Michalova K, Neuwirtova R, Cermak J. TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2016;7(24):36266–36279. **IF = 5,168**
- Belickova M, Merkerova MD, Votavova H, **Valka J**, Vesela J, Pejsova B, Hajkova H, Klema J, Cermak J, Jonasova A. Up-regulation of ribosomal genes is associated with a poor response to azacitidine in myelodysplasia and related neoplasms. *Int J Hematol*. 2016;104(5):566–573. **IF = 1,942**

Ostatní publikace za dobu studia

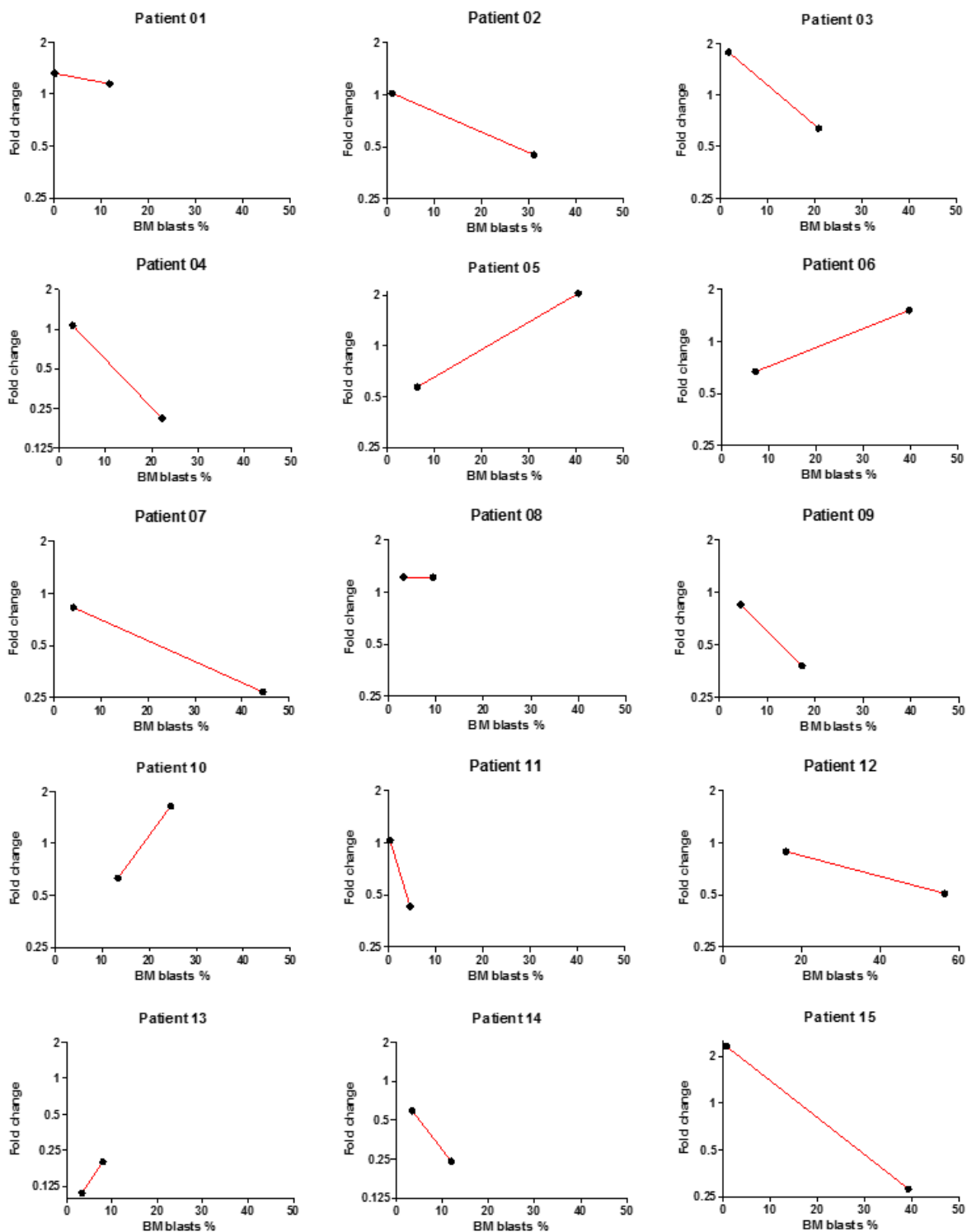
- **Valka J**, Cermak J. Diferenciální diagnostika anémií. *Vnitř lék*. 2018;64(5):468–475.
- **Valka J**, Cermak J, Marinov I. Paroxysmální noční hemoglobinurie. *Farmakoterapie*. 2018;14(3):395–400.
- Cermak J, **Valka J**, Vostry M, Skranc S, Belickova M. Centrum pro vzácné choroby červené krevní řady v Ústavu hematologie a krevní transfuze. *Transfuze hematol. dnes*, 2017;23,Supplementum1:76–85.

Přílohy

Příloha číslo 1. Křivky znázorňující na ose Y expresi genu *RAD51* u konkrétních pacientů v průběhu progresu onemocnění vyjádřené na ose X jako zvyšující se procento blastů v KD. Povšimněte si křivky u pacienta číslo 5, po překročení hranice cca 30 % blastů v KD dochází k opětovnému vzrůstu exprese genu (podobně vzrůst exprese u pacientů č. 6 a č. 10).



Příloha číslo 2. Křivky znázorňující na ose Y expresi genu *XRCC2* u konkrétních pacientů v průběhu progresu onemocnění vyjádřené na ose X jako zvyšující se procento blastů v KD. U pacientů č. 5, č. 6 a č. 10 vzestup exprese po dosažení hranice cca 30 % blastů.



Příloha číslo 3 – reprint publikace:

Valka J, Vesela J, Votavova H, Dostalova-Merkerova M, Horakova Z, Campr V, Brezinova J, Zemanova Z, Jonasova A, Cermak J, Belickova M. Differential expression of homologous recombination DNA repair genes in the early and advanced stages of myelodysplastic syndrome. *Eur J Haematol*. 2017;99(4):323–331. **IF = 2,595**

Příloha číslo 4 – reprint publikace:

Valka J, Vesela J, Votavova H, Dostalova-Merkerova M, Urbanova Z, Jonasova A, Cermak J, Belickova M. Genetic variant screening of DNA repair genes in myelodysplastic syndrome identifies a novel mutation in the XRCC2 gene. *Oncol Res Treat* (under review). Submitted 2018-06-13. **IF = 1,494**

Příloha číslo 5 – reprint publikace:

Belickova M, Vesela J, Jonasova A, Pejsova B, Votavova H, Merkerova MD, Zemanova Z, Brezinova J, Mikulenkova D, Lauermannova M, **Valka J**, Michalova K, Neuwirtova R, Cermak J. TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2016;7(24):36266-36279.
IF = 5,168

Příloha číslo 6 – reprint publikace:

Belickova M, Merkerova MD, Votavova H, **Valka J**, Vesela J, Pejsova B, Hajkova H, Klema J, Cermak J, Jonasova A. Up-regulation of ribosomal genes is associated with a poor response to azacitidine in myelodysplasia and related neoplasms. *Int J Hematol*. 2016;104(5):566–573.
IF = 1,942

Příloha číslo 7 – autoreferát disertační práce (viz zadní strana vazby)